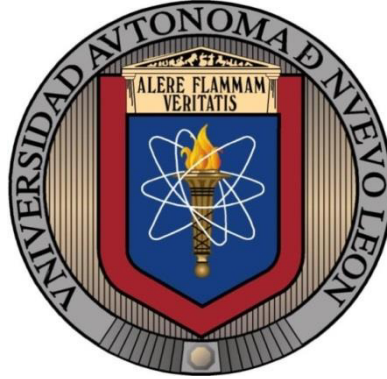


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



TESIS

**EL ENVEJECIMIENTO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE GENES
DE RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN *Yarrowia lipolytica***

POR

HIPÓLITO OTONIEL MIRANDA ROBLERO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

DICIEMBRE, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN
SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO



TESIS

**EL ENVEJECIMIENTO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE GENES DE
RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN *Yarrowia lipolytica***

POR

HIPÓLITO OTONIEL MIRANDA ROBLERO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

Monterrey, Nuevo León, México

Diciembre, 2016

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo Campos Góngora por sus enseñanzas y su amistad.

A mis amigos Miguel Mena, Ernesto Balderas, Juan Manuel Pérez Amaro, Joshimar Moreno y Juan Pablo Roldan quienes llegaron en el momento más oportuno, gracias por sus sabios consejos. Sin duda alguna: amigos memorables.

A Carlos Edenilson amigo desde la infancia, gracias por tus enseñanzas “comando nunca muere”.

A Alejandra Briones, gracias por todo tu apoyo y comprensión...

A Richie, gracias por tu confianza y compañía. Gracias por los ánimos. Amigo

A mis compañeros de laboratorio Gerardo, Clarita y Gabi gracias por las enseñanzas y los gratos momentos que pasamos.

A la Facultad de Salud Pública y Nutrición, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de investigación en sus laboratorios.

Agradezco al pueblo de México que por medio del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) hizo posible la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres:

Librado Miranda Ángel

Sofía Roblero Pérez

«No habrá gloria ni honor de todo lo que hemos creado y formado, hasta que no exista la criatura humana, la criatura dotada de razón»

—Fragmento tomado del Popol Vuh.

TABLA DE CONTENIDO

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Planteamiento del problema	2
2.2	Justificación	3
3	HIPÓTESIS	4
4	OBJETIVOS	4
4.1	General	4
4.2	Específicos	4
5	ANTECEDENTES	5
5.1	Estrés oxidativo	5
5.2	Envejecimiento	9
5.3	Mecanismos de envejecimiento en levaduras	10
5.3.1	Vida replicativa	11
5.3.2	Vida cronológica	12
5.4	Papel del estrés oxidativo en el envejecimiento	13
5.5	Mecanismo de defensa antioxidante: enzimas antioxidantes	16
5.5.1	Superóxido dismutasas (Sod)	16
5.5.2	Catalasas (Cat)	17
5.5.3	Glutatión peroxidasas (Gpx)	18
5.6	<i>Yarrowia lipolytica</i> como modelo de estudio	19
6	MATERIALES Y MÉTODO	20
6.1	Diseño del estudio	20
6.2	Estrategia general de trabajo	21
6.2.1	Preparación de medios de cultivo	22
6.2.2	Preparación de pre-inóculos e inóculo	22
6.2.3	Curva de crecimiento de <i>Y. lipolytica</i>	23
6.2.4	Inducción del estrés oxidativo en los cultivos	23
6.2.5	Búsqueda <i>in silico</i> de secuencias de posibles genes constitutivos de <i>Y. lipolytica</i>	24
6.2.6	Diseño de oligonucleótidos específicos	24
6.3	Obtención y procesamiento del material genético	25
6.3.1	Extracción de ácidos nucleicos	25

6.3.2	Cuantificación y ajuste de la concentración de los ácidos nucleicos	26
6.3.3	Obtención del RNAm	26
6.3.4	Síntesis de ADNc	27
6.3.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
6.4	Electroforesis en geles de agarosa	29
6.5	Análisis de resultados.....	30
7	RESULTADOS	31
7.1	Identificación de las fases de crecimiento de <i>Y. lipolytica</i>	31
7.2	Identificación <i>in silico</i> de secuencias de genes constitutivos y de genes que codifican para enzimas antioxidantes de <i>Y. lipolytica</i> ; diseño de oligonucleótidos específicos.	32
7.3	Obtención de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y tratamiento con DNasa. ..	34
7.4	Análisis de la expresión de posibles genes constitutivos en células de <i>Y. lipolytica</i> bajo condiciones de estrés oxidativo: <i>ACT</i> , <i>ALG9</i> y <i>UBC6</i>	35
7.5	Análisis de expresión de los genes <i>CAT</i> , <i>SOD</i> y <i>GPX</i> en células de <i>Y. lipolytica</i> sometidas a estrés oxidativo.	37
7.6	Análisis de expresión de los genes que codifican para catalasas de <i>Y. lipolytica</i> sometida a estrés oxidativo.....	42
7.7	Análisis de la expresión de los genes <i>SOD1</i> Y <i>SOD2</i> de células de <i>Y. lipolytica</i> sometidas a condiciones de estrés oxidativo.	43
7.8	Análisis de la expresión del gen <i>GPX</i> en <i>Y. lipolytica</i> bajo condiciones de estrés oxidativo.....	44
8	DISCUSIÓN	45
8.1	Expresión de genes constitutivos de células de <i>Y. lipolytica</i> sometidas a condiciones de estrés oxidativo: <i>ACT</i> , <i>ALG9</i> y <i>UBC6</i>	45
8.2	Expresión de los genes <i>CAT</i> , <i>SOD</i> y <i>GPX</i> en células jóvenes y envejecidas de <i>Yarrowia lipolytica</i>	47
8.3	Genes de respuesta antioxidante en <i>Y. lipolytica</i> : <i>CAT</i> , <i>SOD</i> y <i>GPX</i>	48
8.4	Expresión temprana de los genes <i>CAT</i> , <i>SOD</i> y <i>GPX</i> de <i>Y. lipolytica</i> en respuesta al estrés oxidativo.....	52
9	CONCLUSIONES	56
10	REFERENCIAS	57

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1	Componentes de la reacción 1 para la síntesis de ADNc	29
2	Componentes de la reacción 2 para la síntesis de ADNc	29
3	componentes de la reacción de PCR	30
4	Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de fragmentos específicos de los genes <i>SOD</i> , <i>CAT</i> , <i>GPX</i> , <i>ACT</i> , <i>ALG9</i> y <i>UBC6</i> de <i>Y. lipolytica</i>	31
5	Características de los genes y primers usados para el análisis de expresión: <i>ACT</i> , <i>ALG9</i> , <i>UBC6</i> , <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> , <i>CAT3</i> , <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> , y <i>GPX</i>	35
6	Análisis comparativo de la expresión de los genes constitutivos: <i>ACT</i> , <i>ALG9</i> y <i>UBC6</i> de células de <i>Y. lipolytica</i> sometidas al efecto de diferentes agentes oxidantes	38
7	Comparación entre tratamientos con respecto al control del Incremento de la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes	41

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS)	7
2	Esquema de los modelos de envejecimiento replicativo y cronológico en levaduras	11
3	Curva de crecimiento de <i>Y. lipolytica</i>	33
4	Análisis de los productos de PCR de los fragmentos de los genes constitutivos, sobre ADN genómico de <i>Y. lipolytica</i> .	34
5	Ácidos nucleicos extraídos de células sometidas a diferentes tratamientos.	36
6	PCR sobre tratamientos con DNasa	37
7	Comparación de los niveles de expresión de los genes <i>ACT</i> , <i>ALG9</i> y <i>UBC6</i> en células de <i>Y. lipolytica</i> sometida a condiciones de estrés oxidativo	38
8	Imagen representativa de los productos de RT-PCR obtenidos para cada gen	40
9	Expresión basal de los genes de respuesta antioxidante	41
10	Comparación de los niveles de expresión de los diferentes genes de respuesta antioxidante en células jóvenes y envejecidas, a diferentes tiempos (15 y 60) min de tratamiento con H ₂ O ₂ (4.5 mM).	43
11	Comparación de los niveles de expresión de los genes <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> y <i>CAT3</i>	44

12	Comparación de los niveles de expresión de los genes <i>SOD1</i> y <i>SOD2</i>	45
13	Comparación de los niveles de expresión de los genes <i>GPX</i>	46

NOMENCLATURA

<i>ACT</i>	Actina
<i>ALG9</i>	Alfa-1,2 manosiltransferasa
<i>CAT</i>	Catalasa
ADNc	ADN complementario
dNTPs	Deoxinucleótidos
EO	Estrés oxidativo
<i>GPX</i>	Glutación peroxidasa
Gal	Ácido gálico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
Men	Menadiona
ml	Mililitro
ARNm	ARN mensajero
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
OD	Densidad óptica
ONOO ⁻	Peroxinitrito
-OH	Radical hidroxilo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
<i>SOD</i>	Superóxido dismutasa
seg	Segundo

TA	Temperatura ambiente
<i>UBC6</i>	Enzima de conjugación a ubiquitina
μl	Microlitro
YPD	Medio de cultivo: extracto de levadura peptona dextrosa

1 RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas que cumplen un rol importante integrando diversas vías de señalización para el buen funcionamiento celular. Las ERO están controlados finamente por las enzimas antioxidantes: catalasas (Cat), superóxido dismutasas (Sod) y glutatión peroxidasas (Gpx); sin embargo, cuando se rompe el equilibrio redox entre las enzimas antioxidantes y los niveles de las ERO, las ERO reaccionan con macromoléculas (hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) oxidándolas y ocasionando daño celular a mayor escala que converge en estrés oxidativo (EO). Es pues, en este punto central en donde el EO toma relevancia al estar relacionado con el desarrollo y progresión de diversas patologías como diabetes mellitus, hipertensión, aterosclerosis y cáncer, entre otras.

En este trabajo experimental, el objetivo central fue comparar el patrón de expresión de los genes que codifican para enzimas antioxidantes en diferentes etapas de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* sometidas a estrés oxidativo. Se identificaron las diferentes etapas del ciclo de vida de *Y. lipolytica*, obteniendo así, células jóvenes a las 12 h y células envejecidas a las 96 h (4 días) de cultivo. Para analizar la expresión de genes de respuesta antioxidante, las células jóvenes y envejecidas de *Y. lipolytica* se sometieron a estrés oxidativo agregando peróxido de hidrogeno (H_2O_2 , 4.5 mM) al medio de cultivo durante 15 y 60 min y por transcriptasa reversa (RT-PCR) se determinaron los niveles de expresión de los genes que codifican para catalasas y superóxido dismutasas, glutatión peroxidasa. Los resultados obtenidos indican que la respuesta de las células frente al estrés oxidativo resultó en un aumento de la expresión de los genes *CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *SOD1*, *SOD2* Y *GPX* siendo las células envejecidas las que presentaron valores mayores que las jóvenes, a los primeros 15 min de tratamiento, retomando valores semejantes a los basales a los 60 min. La expresión de los genes *CAT3* y *SOD1* fue mayor que la de todos los genes en células envejecidas.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Planteamiento del problema

A lo largo de la vida de la célula, ésta experimenta cambios que le permiten adaptarse a las agresiones del entorno. Este proceso de adaptación modifica la respuesta que la célula tiene frente a estímulos fisiológicos excesivos, mediante el cual se consigue mantener un equilibrio relativo de la viabilidad y la función de la propia célula. Se sabe que el estrés oxidativo compromete la respuesta de la célula para eliminar las ERO ya que deteriora la reparación del ADN, la señalización celular y aceleran el envejecimiento; aunado a las anormalidades cromosómicas, el incremento de los productos génicos que inhiben la división celular, la disminución de la longitud de los telómeros, disminución del metabolismo, disminución del control homeostático y la disminución en la adaptación a agresiones del entorno, características que son propias del envejecimiento. Durante el envejecimiento, la acumulación de ERO podría exceder la capacidad de la defensa antioxidante de las células para deshacerse ellas, lo cual limitaría aún más la función de los sistemas de reparación celular, creando un ciclo de retroalimentación positiva y acelerando el envejecimiento (Beckman & Ames, 1998; Sohal & Weindruch, 1996).

En la presente investigación se utilizó como modelo de estudio al organismo eucariota *Yarrowia. Lipolytica* para conocer el efecto que tiene el envejecimiento celular sobre la expresión de los genes que participan en la respuesta antioxidante.

2.2 Justificación

El estrés oxidativo (EO) ocupa un papel central en el proceso de envejecimiento, los estilos de vida, la dieta, desórdenes clínicos y un grupo de enfermedades relacionadas con la edad, incluido el cáncer, aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas. El EO causa un importante daño a componentes celulares que puede conllevar a trastornos serios.

La complejidad de las células humanas las hace difícil para su manipulación en biología molecular. Es por ello que se han considerado a las levaduras como modelo de células eucariotas, ya que los procesos celulares están íntimamente relacionados y conservados en organismos superiores, como el ser humano. Además, las levaduras tienen una elevada tasa de crecimiento, son de fácil manipulación y su genoma está completamente secuenciado.

En *Yarrowia lipolytica*, un organismo eucariota, se conoce muy poco sobre los efectos que el envejecimiento tiene sobre los mecanismos de defensa antioxidante.

Conocer el efecto que el envejecimiento tiene sobre la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la defensa antioxidante de *Y. lipolytica*, permitirá establecer un modelo adecuado para el análisis de diferentes moléculas con potencial actividad oxidante o antioxidante.

3 HIPÓTESIS

El envejecimiento celular compromete la respuesta de las células al estrés oxidativo, modificando la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Comparar el patrón de expresión de los genes que codifican para enzimas antioxidantes en diferentes etapas de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* sometidas a estrés oxidativo.

4.2 Específicos

- Identificar el uso de un gen constitutivo en células de *Yarrowia lipolytica* sometidas a estrés oxidativo.
- Determinar el patrón de expresión de los genes *CAT*, *SOD* y *GPX* en células de *Yarrowia lipolytica*, en diferentes etapas de su crecimiento.
- Determinar el patrón de expresión de genes del sistema antioxidante de células de *Y. lipolytica*, sometidas a estrés oxidativo por efecto del agente oxidante H_2O_2 .
- Comparar la respuesta celular antioxidante de células jóvenes y envejecidas de *Y. lipolytica*, mediante la expresión de los genes *CAT*, *SOD* y *GPX*.

5 ANTECEDENTES

5.1 Estrés oxidativo

El término común para referirse al estrés oxidativo (EO) se centra en un desequilibrio entre los agentes oxidantes y la defensa/protección antioxidante (Forman & Torres, 2001). El EO es causado principalmente por radicales libres (RL), los cuales son moléculas pequeñas, difusibles y altamente reactivas, debido a que poseen un electrón no apareado (Forman & Torres, 2001). Los RL fueron considerados originalmente por ser radicales centrados en el oxígeno, actualmente son llamados especies reactivas de oxígeno (ERO) (Madamanchi & Runge, 2005). Los RL actúan como segundos mensajeros, que interfieren en múltiples procesos fisiológicos normales; funcionan como segundos mensajeros, en el crecimiento y diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis. Sin embargo, cuando los niveles de ROS sobrepasan la defensa antioxidante pueden propagarse perjudicialmente para causar daño molecular a los tejidos biológicos y mecanismos de señalización.

Así, el daño que le puede ocurrir a las células es el resultado de un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad del sistema biológico para reparar dicho daño. En células eucariotas, las ERO se producen generalmente durante la respiración metabólica, la fagocitosis o en respuesta a la acción de diversos factores de crecimiento y citoquinas. Por lo tanto, el EO se produce por la acción que ejercen las especies oxidativas en macromoléculas: lípidos, membranas, proteínas y ácidos nucleicos de la célula sin posibilidad de reparación, lo que culmina en el desarrollo de patologías y el envejecimiento (Jay Forman & Torres, 2001; Jones, 2008; Madamanchi & Runge, 2005; Varnum, Sowa, & Morgan, 2013).

Las ERO son por lo tanto, la unidad básica del EO. En las células eucariotas, las ERO provienen de fuentes endógenas y exógenas cuyos efectos oxidativos pueden ser mitigados por el mecanismo de defensa celular (antioxidantes endógenos y exógenos) (Fig.1) (Bansal & Kaushal, 2014).

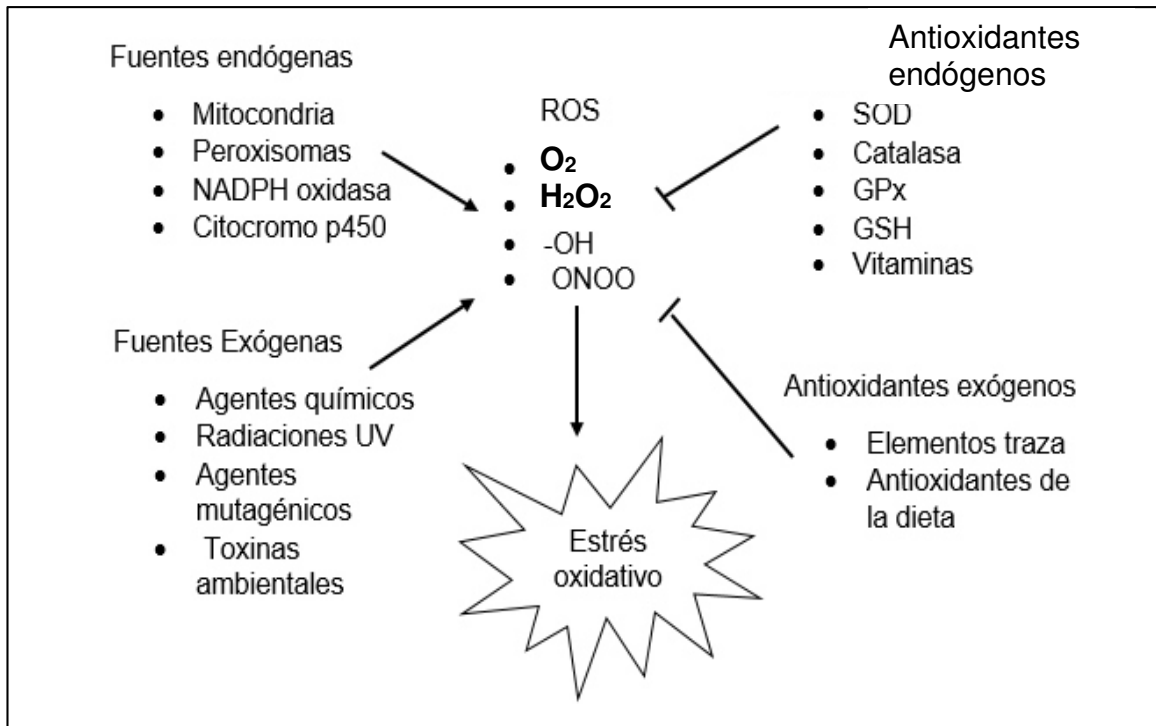


Figura 1. Fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen a la inducción de estrés oxidativo y mecanismos de defensa celular contra ROS (antioxidantes exógenos y endógenos)

El EO ocupa un papel central en una variedad de patologías metabólicas tales como diabetes, obesidad, aterosclerosis, cáncer y otras complicaciones secundarias asociadas con ERO. Las ERO y el mecanismo molecular activado por estas son factores unificadores en éstas enfermedades.

Obesidad: la obesidad es una enfermedad multifactorial, influenciada por factores genéticos y ambientales. El inicio de la obesidad se debe principalmente al bajo gasto energético, combinado con una ingesta alta de calorías. Esto conduce a una acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo, acompañada de inflamación de bajo grado, hipoxia y EO (Balistreri, Caruso, & Candore, 2010)

El tejido adiposo es un órgano endocrino que produce una variedad de moléculas, incluyendo adipocinas tales como adiponectina y leptina, y citocinas, como factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleucinas 1 β (IL-1 β) y 6 (IL-6) (Balistreri, Caruso, & Candore, 2010; Trayhurn & Wood, 2004). El tejido adiposo en los individuos obesos sufre muchos cambios patológicos debido a la acumulación de grasa, tales como la inflamación, la hipoxia y el aumento del EO (Bondia-Pons, Ryan, & Martinez, 2012; Trayhurn, 2013). Con la acumulación de grasa excesiva, el perfil de secreción de adipoquina se altera y los tejidos periféricos se ven afectados, lo que contribuye a la aparición de problemas de salud como la dislipidemia, la hipertensión, la resistencia a la insulina, la diabetes y la aterosclerosis (Rupérez, Gil, & Aguilera, 2014).

El consumo excesivo de dietas altas en grasas y carbohidratos está asociado con la obesidad y puede ser responsable en parte, de la mayor producción de ERO, debido a la saturación de la cadena de transporte de electrones. Los ácidos grasos libres (FFA) han tenido este efecto en los modelos murinos (Furukawa et al., 2004), y en los seres humanos, los FFAs generar altos niveles de H₂O₂ en la mitocondria (Anderson et al., 2009). Por lo tanto, el vínculo entre la obesidad y el aumento del EO podría ser debido a la hiperglucemia, FFA circulante alto, disminución de las defensas antioxidantes y la inflamación crónica asociada con la obesidad (Rupérez et al., 2014).

Aterosclerosis: las enfermedades cardiovasculares son el resultado de una cantidad múltiple de factores de riesgo aterosclerótico que interactúan de diferentes maneras en la generación de eventos isquémicos (Perk et al., 2012). El papel patogénico y el pronóstico de algunos de estos factores de riesgo, como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, la hipercolesterolemia, la obesidad, la edad avanzada y el hábito de fumar. Sin embargo, detrás de los mecanismos que contribuyen a la aterosclerosis, diversos estudios demuestran que todas estas condiciones se caracterizan por un evento común: el EO (Perk et al., 2012)

La teoría del “EO” de la aterosclerosis se basa en la suposición de que la fase inicial de la aterosclerosis es sostenida por la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), dependiente de ERO producida por las células de la sangre y por las células endoteliales. Las LDL se acumulan dentro de la pared de la arteria y son tomadas por los monocitos y macrófagos a través de los receptores, la formación de células espumosas, promoviendo así una serie de respuestas inflamatorias y en última instancia conduciendo a la formación de la placa aterosclerótica (Perk et al., 2012; Ross, 1999; Stocker & Keaney, 2004)

Cáncer: el EO es característico de muchos tumores. El aumento incontrolado de ERO puede provocar daño directo a las proteínas, lípidos y a los ácidos nucleicos (Dröge, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que los niveles más bajos de ERO pueden activar las vías de señalización intracelular que conducen a la proliferación celular y la transcripción de genes. Las ERO pueden ser potencialmente carcinogénicas y promover la progresión tumoral (Dröge, 2002). Por tanto, se ha supuesto que el EO contribuye a la iniciación y progresión del tumor. En las últimas dos décadas, se ha sugerido que además de causar la inestabilidad genómica, las ERO también pueden aumentar la tumorigénesis mediante la activación de vías de señalización que regulan la proliferación celular, la angiogénesis y la metástasis (Dröge, 2002; Trachootham, Lu, Ogasawara, Valle, & Huang, 2008).

Diabetes mellitus: la diabetes tipo 1 y tipo 2, están claramente asociadas con la alteración de la producción en las ERO, aunque la relación de causa y efecto aún permanecen en disputa (Sivitz, 2014). Muchos estudios documentan la existencia de un daño oxidativo en la diabetes (Kanauchi, Nishioka, & Hashimoto, 2002). Por ejemplo, marcadores plasmáticos de la oxidación lipídica tales como 8-iso-prostaglandina F2 e hidroperoxidación lipídica, están claramente elevados en el curso de la diabetes tipo 1, al mismo tiempo que la capacidad antioxidante se ve disminuida (Marra et al., 2002). Por otra parte, se ha detectado daño en el ADN en los linfocitos de sujetos con diabetes insulino-dependientes, lo que representa una fuerte evidencia del daño oxidativo en células y tejidos de personas con diabetes tipo 2 (Kanauchi, Nishioka, & Hashimoto, 2002; Shin et al., 2001).

5.2 Envejecimiento

El envejecimiento, también conocido como senescencia, es el fenómeno por el cual las células pierden la capacidad de dividirse. El envejecimiento implica daño del ADN, el acortamiento de los telómeros y autodestrucción de la célula (a través de la apoptosis) (Marín-García, Goldenthal, & Moe, 2008). Ideas recientes sobre los determinantes genéticos del envejecimiento se han obtenido a partir de estudios con modelos eucariotas (*S. cerevisiae*) ya que tienen un periodo de envejecimiento de corta duración, que a diferencia de los seres humanos, son susceptibles de análisis genético molecular en el laboratorio (Holzenberger, 2004). La conservación de vías metabólicas y de señalización entre la levadura y los seres humanos es sorprendentemente alta, dando lugar a la expectativa de que los mecanismos de envejecimiento también son similares en ambos organismos; además, muchos de los genes que extienden la duración de la vida útil de la levadura tienen homología con los genes humanos (Holzenberger, 2004; Katic & Kahn, 2005; Sinclair, 1999).

5.3 Mecanismos de envejecimiento en levaduras

Las cepas de levaduras estandarizadas en el laboratorio pueden producir solo un número limitado de células hijas (alrededor de 20-30) durante toda la vida. Este proceso tarda alrededor de 2-3 días en un medio complejo a 28°C y, por lo tanto, es el proceso de envejecimiento más rápido que se produce. Los primeros estudios de envejecimiento en levadura datan de hace más de 50 años, cuando se demostró su capacidad finita de división. Las células madre de estos microorganismos se dividen por mitosis asimétrica, también conocida como gemación, dando lugar a células hijas más pequeñas (Mortimer & Johnston, 1959). Con el tiempo, la célula madre experimenta un deterioro progresivo relacionado con la edad, acumula material tóxico como círculos extracromosómicos de ADN ribosomal y agregados de proteínas dañadas, hasta envejecer y finalmente perder su capacidad de gemación. Existen dos modelos para evaluar la esperanza de vida y el envejecimiento en la levadura: el replicativo y el cronológico (Fig.2). Ambos mecanismos resultan de enorme interés, considerando que organismos más complejos, como el humano, se rigen igualmente por ambos modelos.

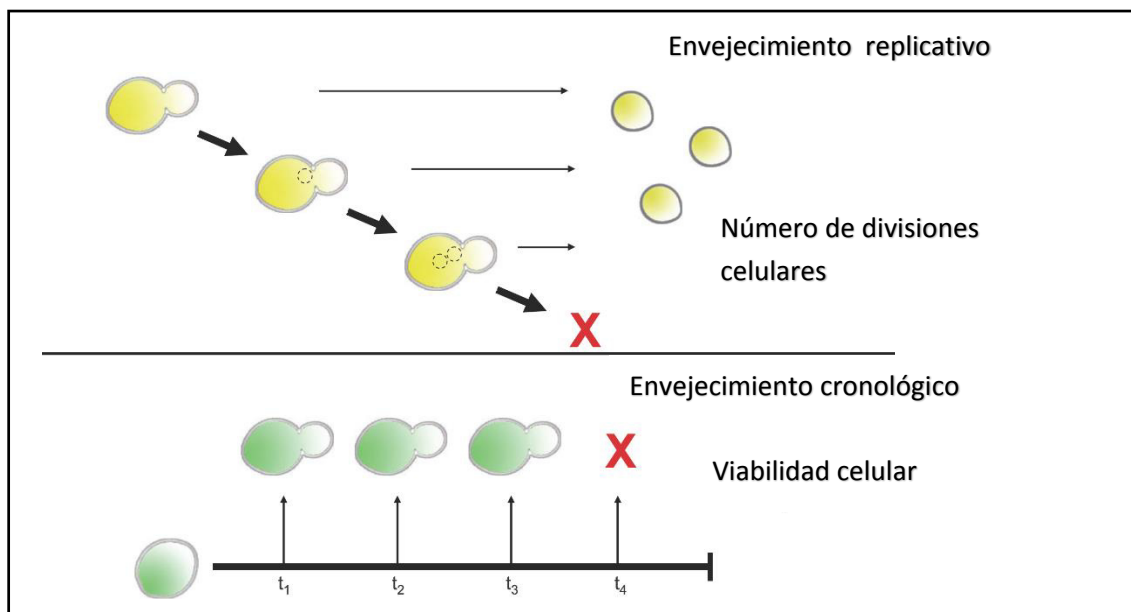


Figura 2. Esquema de los modelos de envejecimiento replicativo y cronológico en levaduras.

5.3.1 Vida replicativa

La esperanza de vida replicativa determina el número de divisiones que una célula madre experimenta antes de su muerte, esto resulta en una acumulación de material celular dañado, el cual es asimétricamente segregado después de cada división en el que se obtiene material genético en buen estado. En la naturaleza, esto contribuye al crecimiento mitótico rápido de una población en condiciones ricas en nutrientes; por lo tanto, las células hijas exhiben una capacidad replicativa intacta para promover la supervivencia poblacional a costa de la célula madre que pierden su capacidad replicativa en cada división. Se ha demostrado que las células imitan el tiempo de generación de las madres que las producen, de manera que las hijas de madres de mayor edad suelen tener un mayor tiempo de generación. Esta manifestación de envejecimiento opera a partir de un factor de senescencia citoplasmática difusible, que aparece con la edad en la célula madre. Los cambios en el envejecimiento celular que constituyen el factor de senescencia no pueden invertirse fácilmente, especialmente porque la célula se vuelve más vieja (Jazwinski, 2003).

Después de 25-30 ciclos de división, las células madre comienzan a morir, mostrando marcadores apoptóticos tales como la producción excesiva ERO, la externalización de fosfatidilserina y la fragmentación del ADN. Por lo tanto, el envejecimiento replicativo refleja la senescencia bajo condiciones proliferativas y también puede modelar el proceso de envejecimiento de las células mitóticamente activas en eucariotas superiores, incluyendo las poblaciones de células madre humanas (Zhang et al., 2012). Las proteínas se encuentran entre el material distribuido asimétricamente después de la división, lo que resulta en la acumulación de proteínas dañadas en las células madre con cada ciclo (Kruegel et al., 2011). Por lo que las levaduras se someten a un proceso similar de apoptosis al final de la duración de la vida replicativa (Laun et al., 2001).

Es importante destacar que las mitocondrias también están distribuidas asimétricamente en la división celular (McFaline-Figueroa et al., 2011) y que puede ser un factor del envejecimiento replicativo (Carmona-Gutierrez & Büttner, 2014). El detrimento inducido por ERO se produce principalmente en las mitocondrias dañadas y, aunque la conexión causal entre el daño oxidativo y el envejecimiento replicativo necesita más aclaraciones, tanto la fragmentación mitocondrial y la producción de ERO empiezan a aumentar después de algunas divisiones (Lam, Aung-Htut, Lim, Yang, & Dawes, 2011). El tiempo de generación o duplicación aumenta en las células individuales a medida que estas progresan en su ciclo de vida replicativo (Egilmez & Jazwinski, 1989). La tasa de mortalidad relacionada con la edad se incrementa de manera exponencial tras el número de veces que la célula se divide (Pohley, 1987). Se ha propuesto que las mitocondrias juegan un papel determinante en la regulación de la activación de factores pre-apoptóticos residentes como el factor inductor de apoptosis Aif1p; el efecto de estas proteínas en la muerte apoptótica durante el envejecimiento replicativo todavía necesita ser más estudiado (Carmona-Gutierrez & Büttner, 2014).

5.3.2 Vida cronológica

El segundo paradigma del envejecimiento es la vida cronológica, la cual representa el tiempo en que un cultivo sobrevive en fases discontinuas y estacionarias. Se realiza por una parte, a través de la acumulación de biomoléculas y estructuras dañadas en la célula y, por otro lado a través de la deficiencia de moléculas esenciales. Los daños acumulados son llamados factores de envejecimiento, mientras que el propio mecanismo se denomina mecanismo cronológico de envejecimiento (Bitterman, Medvedik, & Sinclair, 2003; Osiewacz & Hamann, 2006). El envejecimiento cronológico de la levadura es un modelo para estudiar los factores que afectan el envejecimiento de los tejidos y tipos de células postmitóticas en eucariotas superiores, tales como el músculo o el cerebro (Herker et al., 2004).

Los cultivos de levaduras en fase estacionaria se dividen en dos poblaciones: una quiescente y una no quiescente; la primera está compuesta de células hijas sanas con potencial de replicación completa y la segunda formada por células más viejas, con mayores niveles de ERO, marcadores de apoptosis y necrosis (Allen et al., 2006). Es importante destacar que la muerte temprana durante el envejecimiento se encuentra combinada con una alta frecuencia de mutaciones y están vinculadas a superóxido como un regulador que parece favorecer la adaptación y crecimiento en un entorno en constante cambio, beneficiando así la supervivencia, a pesar de que la apoptosis juega un papel central en este proceso (Allen et al., 2006).

El envejecimiento cronológico está regulado por dos vías: sensores de nutrientes y las controladas por RAS-PKA y TOR-Sch9. La regulación genética dependiente de nutrientes de estas vías, estimula la proteína quinasa Rim15p, que a su vez promueve la activación de la transcripción en respuesta a factores de estrés y, finalmente se extiende la vida cronológica. La naturaleza compleja del envejecimiento cronológico se refleja en sus efectos adversos, entre ellos la mutagénesis, el EO, la disfunción mitocondrial, cambios en la composición de los lípidos o una reducción en el número de células (Eisenberg & Büttner, 2014; Eisenberg et al., 2009; Yorimitsu, Zaman, Broach, & Klionsky, 2007).

5.4 Papel del estrés oxidativo en el envejecimiento

La teoría del envejecimiento celular postulada por Harman (1956) refiere un daño progresivo y acumulativo que la célula no puede reparar por sí misma. Por otro lado, otras teorías apoyan y refutan lo propuesto por Herman, la más relevante sostiene que, a medida que las células envejecen se vuelven menos eficientes y menos capaces de deshacerse de los residuos y productos tóxicos y, finalmente, cuando ya no son capaces de funcionar en absoluto, mueren (Marín-García et al., 2008).

Existen una serie de mecanismos que están implicados en las vías del envejecimiento celular, así como una serie de factores ambientales, incluyendo nutrientes y estímulos de estrés, que pueden retardar o acelerar el envejecimiento (Marín-García et al., 2008).

La teoría de las ERO del envejecimiento celular supone que éste resulta de la acumulación de lesiones orgánicas debidas a las ERO (McCabe, Nicotera, & Orrenius, 1992). Las ERO han sido consideradas como los factores causales del envejecimiento y de algunos tumores malignos (Konat, 2003); así, la muerte celular inducida por el envejecimiento y éste último por las ERO puede ser producida por la degeneración final de los orgánulos donde el mecanismo subyacente implica daño al ADN genómico (Konat, 2003; Rockenfeller & Madeo, 2010).

Los estudios en células de levaduras han proporcionado datos de gran valor acerca de los mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento y su relación con el EO. Las levaduras han representado un sistema ideal para estudiar la regulación de la expresión génica en respuesta a EO, ya que a diferencia de eucariotas superiores, son fácilmente susceptibles a análisis genéticos. Las levaduras son conocidas por tener un sistema efectivo de enzimas antioxidantes que son capaces de desactivar las ERO, manteniendo de este modo el balance redox (Herrero, Ros, Bellí, & Cabiscol, 2008). La respuesta de las levaduras frente al EO es dependiente de la dosis: es decir, a dosis por debajo del nivel en el que se produce la muerte celular, las células se adaptan al ambiente oxidativo, por el contrario a dosis más altas las células retardan la división celular e inducen el mecanismo de defensa y reparación antioxidante (Alic, Higgins, & Dawes, 2001; Gasch et al., 2000).

Estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae* sometida a EO, han demostrado que en respuesta al EO se activan las enzimas catalasas, superóxido dismutasas y las glutatión peroxidasas. Estudios en *S. cerevisiae* en donde la delección del gen *SOD1* y la exposición de la célula a ERO conducen a una muerte celular temprana de *S. cerevisiae* (Barker, Brimage, & Smart, 1999;

Longo, Gralla, & Valentine, 1996; Longo, Shadel, Kaeberlein, & Kennedy, 2012; Pan, Schroeder, Ocampo, Barrientos, & Shadel, 2011).

Las mutantes de *Caenorhabditis elegans* que incrementaron los niveles de expresión de *SOD* y *CAT* fueron más resistentes al EO y alargaron su periodo de vida (Larsen, 1993); células de *Drosophila melanogaster* cuya defensa antioxidante fue reforzada, mostraron una mayor longevidad y fueron más resistentes a las ERO (Barker et al., 1999; Melov et al., 2000; Pan et al., 2011). Lesur (2004), en un análisis transcripcional en células envejecidas frente a las células jóvenes, reportó que la expresión de ciertos genes sensibles al estrés oxidativo aumenta con la edad. Biriukova (2006), encontró que las células jóvenes de *Yarrowia lipolytica* sometidas a EO por efecto del H_2O_2 fueron menos resistentes que las envejecidas. Estos mismos hallazgos se han encontrado en *S. pombe*, en donde las células envejecidas muestran una mayor actividad de las enzimas antioxidantes que las células jóvenes, en respuesta al EO ocasionado por H_2O_2 .

En células de *S. cerevisiae* se encontró que la actividad de las catalasas, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, podría no ser necesaria para la eliminación del H_2O_2 en células jóvenes, mientras que en las células envejecidas estas enzimas muestran una mayor actividad (Grzelak, Macierzyńska, & Bartosz, 2006; Izawa, Inoue, & Kimura, 1996). En Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* se demostró que el gen *CAT3* se expresaba más en células envejecidas sometidas a estrés oxidativo (Park, Grant, Davies, & Dawes, 1998).

Las mutantes de *S. cerevisiae* deficientes en catalasas son más sensibles al EO inducido por H_2O_2 (Maté et al., 1999; Nishimoto, Watanabe, Furuta, Kataoka, & Kishida, 2016; Spevak et al., 1983). Cuando las células de levaduras fueron sometidas a EO con H_2O_2 (0.4mM) la catalasa citosólica aumentó su actividad hasta 15 veces más que en los controles (Godon et al., 1998). Las catalasas tienen un papel central en la respuesta al EO (Cuéllar-Cruz et al., 2008; Rona et al., 2015), ya que pueden metabolizar niveles altos de H_2O_2 y al mismo tiempo conservar el ambiente redox intracelular (Kuhajda, 2006; Vander Heiden,

Cantley, & Thompson, 2009). Sin embargo, la resistencia al EO viene dada por los antecedentes genéticos, dando como resultado la estimulación temprana de los genes frente al EO (Martins & English, 2014).

Es evidente que el delicado equilibrio entre las ERO y el mecanismos de defensa antioxidante es un aspecto muy importante de los organismos vivos y se logra mediante el mecanismo llamado "regulación redox", que ofrece protección contra el EO y mantiene la "homeostasis redox".

5.5 Mecanismo de defensa antioxidante: enzimas antioxidantes

5.5.1 Superóxido dismutasas (Sod)

Para sobrevivir a la presencia de oxígeno en la tierra, los organismos aeróbicos han desarrollado un grupo de enzimas capaces de catalizar el radical superóxido (O_2^-). La enzima superóxido dismutasa (Sod) que fue descubierta en 1969 por McCord y Fridovich, es una de las enzimas antioxidantes celulares más importantes en los sistemas biológicos, ya que cataliza la eliminación de superóxido por dismutación a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno por dismutación; el H_2O_2 se convierte a continuación en agua y oxígeno por acción de las catalasa (McCord & Fridovich, 1969; Powers, Oberley, & Domann, 2008).

En los animales y hongos hay tres tipos de Sod, una CuZnSod (dependiente de cobre y zinc) dimérica citoplásmica (Sod1), una MnSOD (dependiente de manganeso) tetramérica mitocondrial (Sod2) y una CuZnSod tetramérica extracelular, que están codificados por genes diferentes y difieren en su estructura y localización (Bartosz, 2005). En *S. cerevisiae* se han identificado dos tipos de Sod, un CuZnSod (producto del gen *SOD1*) y MnSod (producto del gen *SOD2*). CuZnSod está presente principalmente en el citoplasma de las células animales pero también se ha encontrado en los lisosomas, peroxisomas, núcleo y el espacio intermembrana de la mitocondria, mientras que MnSod se encuentra

en el espacio de la matriz mitocondrial (Dawson, Katzenback, & Storey, 2015). CuZnSod representa el 85-90% de la actividad total de Sod mientras que MnSod representa el 10-15%. Aunque los MnSods en eucariotas son tetraméricas y en bacterias mayormente diméricas, se ha determinado que las secuencias de aminoácidos de MnSod de animales, plantas y bacterias muestran una homología (Bartosz, 2005).

5.5.2 Catalasas (Cat)

Las catalasas (Cat) son enzimas intracelulares presentes en la mayoría de las células aeróbicas (Kirkman & Gaetani, 2006); en organismos superiores su actividad es mayor en el hígado y los riñones, y tienen una menor actividad en el tejido conectivo y los epitelios y prácticamente nula en el tejido nervioso (Bartosz, 2005). A nivel celular se localizan en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol. Estas enzimas son metaloproteínas tetraméricas, su peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kiloDalton (kDa). Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX, el contenido protohémico y el de hierro representan un 1.1 % y 0.09 % respectivamente del peso molecular total de la enzima (Bartosz, 2005; Sarı, Akgöl, Karataş, & Denizli, 2006).

Basándose en las propiedades físicas y bioquímicas, las catalasas se pueden dividir en tres grupos: el primer grupo tiene actividad peroxidativa también conocidas como catalasas-peroxidasas, el segundo grupo dependiente de manganeso son llamadas catalasas no hemo y finalmente el tercer grupo denominadas catalasas “verdaderas” son catalasas hemo monofuncionales (Ivancich & Loewen, 2013). La transferencia de electrones sólo ocurre en los grupos que contienen hemo. El propósito de la transferencia de electrones en las enzimas hemo es mover electrones a partir de un sustrato rico en electrones, sobre la superficie de la proteína, a una deficiente de electrones, generalmente al hem oxidado. Sin embargo, tanto la catalasa monofuncional como las catalasas con actividad peroxidasa reaccionan con peróxido de hidrógeno directamente en

el sitio hemo del hierro, en el estado de oxidación férrica, actuando como oxidante y reductor.

5.5.3 Glutación peroxidasas (Gpx)

La familia de las Glutación peroxidasas (Gpx) se caracteriza por una tríada catalítica compuesta de una selenocisteína, una glutamina y triptófano (Passardi et al., 2007). Hasta la fecha se han identificado siete miembros de Gpx en los mamíferos, teniendo en cuenta su alta similitud en las secuencias conservadas, función bioquímica y la tríada catalítica característica (Epp, Ladenstein, & Wendel, 1983).

El primer miembro que fue descubierto de esta familia fue la proteína Gpx-5 que actúa como una enzima antioxidante dependiente de glutación, protegiendo a la hemoglobina de la degradación oxidativa (Toppo, Vanin, Bosello, & Tosatto, 2008). Los otros miembros son: Gpx-2 originalmente llamado Gpx-GI, Gpx-3 (secretada principalmente en el plasma) (Takahashi et al., 1990), Gpx-4, (anteriormente conocido como PhGpx: hidroperóxido de fosfolípido Gpx, que es la única proteína activa en hidroperóxidos unidas a la membrana) (Maiorino, Roveri, Ursini, & Gregolin, 1985), GPx-6 que se descubrió expresada específicamente en el epitelio olfativo y anteriormente nombrado como proteína olfativa metabolizada (OMP), la peculiaridad de esta proteína es que se basa en selenocisteína (Kryukov et al., 2003). El último miembro descubierto hasta ahora en los mamíferos es Gpx-7 (basado en serina y cisteína), se ha confirmado que está involucrado en la mitigación de EO en las células de cáncer de mama (Toppo et al., 2008).

5.6 *Yarrowia lipolytica* como modelo de estudio

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucariotas, aunque algunas levaduras parecen ser multicelulares a través de la formación de hifas falsas (Lachance, 2006). Las levaduras se distribuyen entre los phylum *Ascomycota* y *Basidiomycota* del reino de los hongos. Se estima que existen más de 15000 especies de levadura en el planeta, de los cuales 149 géneros y cerca de 1500 especies ya han sido descritas (Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011; Lachance, 2006).

El género *Yarrowia* es una de las levaduras no convencionales de la clase *hemiascomycetes*. Harrison, aisló e identificó el género por primera vez en 1928 (Lachance, 2006). Este género era conocido antes como *Mycotorula*, *Monilia*, *Torula*, *Pseudomonilia*, *Proteomyces*, *Azymoprocandida*, *Candida*, *Endomycopsis*, *Torulopsis* o *Saccharomycopsis* (Lachance, 2006)

Y. lipolytica se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, pues tiene la facilidad de ser aislada de diferentes fuentes que contienen compuestos lipídicos y de hidrocarburos, tales como los alimentos aceitosos y entornos naturales como campos de petróleo (Barth & Gaillardin, 1997). El nombre de la especie *lipolytica* se origina a partir de su notable actividad lipolítica (Gellissen et al., 2005). La temperatura máxima de crecimiento de la mayoría de las cepas de *Yarrowia* está por debajo de 32-34 °C y es considerada como no patógena (Gellissen et al., 2005). Por éstas y otras características fisiológicas, metabólicas y genómicas, *Y. lipolytica* ha sido empleada como modelo celular para diferentes estudios en los últimos años. *Y. lipolytica* es fácilmente manipulable con técnicas básicas de biología y genética molecular, las cuales están bien establecidas. Así mismo, la secuencia de su genoma se encuentra disponible al público desde hace algunos años y, es conocido que varios de sus fenómenos fisiológicos y bioquímicos son semejantes a los de otras células, incluso a sistemas superiores como plantas y animales (Mauersberger, Wang, Gaillardin, Barth, & Nicaud, 2001).

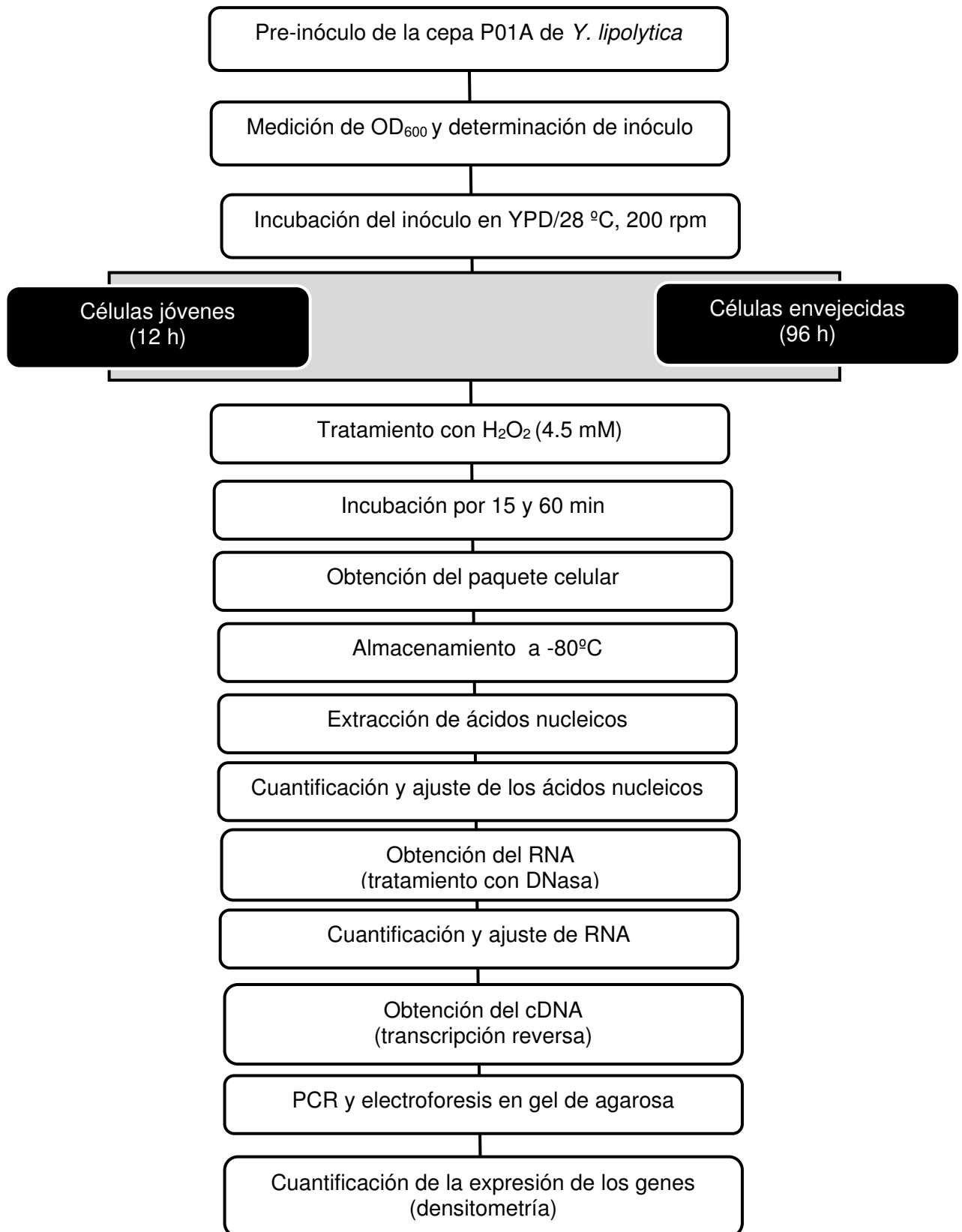
6 MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Diseño del estudio

La presente investigación, de carácter experimental, se realizó de agosto de 2015 a agosto de 2016, empleando como modelo de estudio al hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica*. Células de la cepa P01A de *Y.lipolytica* se sometieron a EO por la adición del agente oxidante peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y su efecto se determinó mediante la expresión de genes, en diferentes etapas del crecimiento celular (logarítmico y estacionario).

Los procesos experimentales se realizaron en el laboratorio de Proteómica ubicado en el Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2 Estrategia general de trabajo



6.2.1 Preparación de medios de cultivo

YPD líquido:

Para el crecimiento de las células de *Y. lipolytica* (cepa P01A) se utilizó el medio YPD líquido, el cual se preparó con extracto de levadura (1%), peptona de caseína (2%) y glucosa anhidra (2%). Los componentes se mezclaron disolviéndolos en agua desionizada. Finalmente, el medio se esterilizó por calor húmedo en autoclave (121 °C y 15 lb/pulg² de presión durante 15 min).

YPD sólido:

Para la preparación de medio YPD sólido, a la mezcla anterior se adicionó el 2 % de agar bacteriológico (10 g), antes de su esterilización.

6.2.2 Preparación de pre-inóculos e inóculo

Para la preparación de los pre-inóculos, se obtuvieron cultivos del cepario del laboratorio de Proteómica del CINSP. En condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar (SG 403A, SterilGARD III Advance) se tomó una colonia de *Y. lipolytica* (placas de YPD sólido) y se sembró en un matraz Erlenmeyer (250 ml) que contenía 50 ml de medio YPD líquido; se colocó en una incubadora con sistema de agitación orbital (Modelo 1575, SL Shel Lab) a 28 °C, con agitación rotatoria a 200 rpm durante toda la noche.

Para estandarizar la cantidad de material biológico utilizado en los diferentes experimentos, se determinó la densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro (UV – Visible Evolution 300, Thermo Scientific), de los pre-cultivos líquidos de la cepa PO1A de *Y. lipolytica*. Para calcular la cantidad de inóculo necesario para tener cada cultivo con una OD inicial de 0.1 ó 0.2, según sea el caso, se utilizó la siguiente formula.

$$V_i = \frac{V_f \times C_f}{C_i}$$

Donde:

Vi: volumen inicial Vf= volumen final Cf= concentración final (0.1-0.4)

6.2.3 Curva de crecimiento de *Y. lipolytica*

Para determinar el crecimiento de *Y. lipolytica* se realizó un cultivo en medio YPD líquido y se incubó a 28 °C con agitación (200 rpm) durante toda la noche. La lectura de la OD₆₀₀ se realizó cada 2 h durante las primeras 12 h, después cada 6 h hasta las 24 h y finalmente cada 24 hasta las 96 h. Los resultados obtenidos se graficaron para generar una curva de crecimiento.

6.2.4 Inducción del estrés oxidativo en los cultivos

Para producir EO en las células de *Y. lipolytica* se utilizó como agente oxidante peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en una concentración de 4.5 mM.

6.2.5 Búsqueda *in silico* de secuencias de posibles genes constitutivos de *Y. lipolytica*

Se realizó una búsqueda *in silico* de las secuencias de los genes constitutivos *UBC6* Y *ALG9*, en bancos de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); posteriormente, utilizando como anzuelo las secuencias obtenidas, se buscaron secuencias homólogas en el genoma de *Y. lipolytica* en la base de datos del consorcio francés Génolevures (<http://genolevures.org>). La secuencia del gen de actina y de los que codifican para las enzimas antioxidantes ya se habían identificado previamente por el equipo de trabajo del laboratorio de Proteómica.

6.2.6 Diseño de oligonucleótidos específicos

Una vez identificadas las secuencias correspondiente a los genes constitutivos *UBC6* y *ALG9* de *Y. lipolytica*, se procedió al diseño de oligonucleótidos específicos de los genes constitutivos y los codificantes de las enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica*. para realizar el análisis de expresión de estos genes por RT-PCR.

Para el diseño de oligonucleótidos es importante considerar características como número de nucleótidos, contenido de guanina–citosina, temperatura de alineamiento, así como evitar la auto complementariedad entre los pares de oligonucleótidos y en el fragmento mismo. Tales características se corroboraron con el programa OligoCalc

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.

6.3 Obtención y procesamiento del material genético

6.3.1 Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de los ácidos nucleicos se utilizó el método fenol-cloroformo modificado por Hoffman y Wiston (1987). Las células de levaduras requieren métodos mecánicos para lograr la lisis celular ya que su pared celular está compuesta de polisacáridos (quitina) que son resistentes a los métodos químicos de lisis convencionales, por lo que para la extracción de ADN genómico fue necesario la utilización de perlas de vidrio para la ruptura mecánica de las células.

A partir de los cultivos celulares se tomaron 1.5 ml de cultivo en tubos de polipropileno para obtener el paquete de células, se centrifugaron durante 2 min a 12,000 rpm (microcentrífuga 5415D, Eppendorf), y el sobrenadante se eliminó por decantación (este primer paso se realizó por segunda vez) y las células cosechadas se resuspendieron en 100 µl de agua destilada. Desde este momento todo el proceso se realizó a 4°C utilizando una hielera con hielo molido. A cada paquete celular se agregaron aproximadamente 100 µl de perlas de vidrio, 400 µl de buffer de lisis (tritón X- 100 2%, tris HCl (pH 8) 10 Mm (Research Organics), SDS 1%, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM (Bio – Rad)) y 400 µl de fenol-cloroformo (1:1) y se sometieron a 3 periodos hielo/agitación con vórtex (1 min/1 min). Los tubos se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm y posteriormente, con una micropipeta se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo (aproximadamente 450 µl). Al sobrenadante recuperado se añadió un 10% de acetato de sodio 3 M (aproximadamente 45 µl resuspendiendo delicadamente y 1 ml de etanol absoluto (99.5 %)); las muestras se mezclaron por inversión y se incubaron por al menos 20 min a – 20 °C. Después se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm; el sobrenadante se eliminó por decantación y la muestra se lavó con 500 µl de etanol al 70%, posteriormente, se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm, el sobrenadante se eliminó por decantación y el exceso se eliminó por aspiración con micropipeta, las muestras se dejaron secar por 5 min a temperatura ambiente; pasado este tiempo los ácidos nucleicos se

resuspendieron en 50 µl de agua destilada estéril. Los tubos se etiquetaron y almacenaron a – 20°C hasta su uso.

6.3.2 Cuantificación y ajuste de la concentración de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos obtenidos se cuantificaron midiendo su OD a 260 nm utilizando el equipo Nanodrop 2000 UV- Visible (Thermo Scientific), y se ajustaron realizando las diluciones correspondientes, a fin de que todas tuvieran una concentración final de 200 ng/µl.

6.3.3 Obtención del ARNm

Para eliminar el ADN y recuperar únicamente el ARN, las muestras de ácidos nucleicos extraídos (mezcla de ADN y ARN) fueron tratadas con la enzima DNasa I PureLink (Invitrogen).

De las muestras de ácidos nucleicos previamente ajustadas (200 ng/µl) se tomaron 8 µl y se colocaron en un tubo de polipropileno de 200 µl de capacidad, se agregó 1 µl de buffer de reacción de DNasa I 10X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM de MgCl₂. 500 mM de KCl) y 1 µl de la enzima DNasa I (Invitrogen). La reacción se incubó por 1 h a 37 °C, después se agregó 1 µl más de la enzima y se incubó por 1 h a 37 °C. Posteriormente, para inactivar la enzima, se agregó 1 µl de EDTA (25 mM) y se incubó durante 10 min a 65 °C. Los tubos se almacenaron a – 20 °C hasta su uso.

La concentración de las muestras tratadas con la enzima DNasa (ARN) se ajustó a 100 ng/µl realizando las diluciones pertinentes con agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato). Después, la concentración final de las muestras se comprobó con el equipo Nanodrop 2000.

6.3.4 Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó el sistema de transcripción reversa GoScript (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso consta de 2 reacciones y se realiza a 4 °C (recipiente con hielo molido). Los reactivos se centrifugaron antes de usar, y para la primera reacción se mezclaron en un tubo cónico de polipropileno de 1.5 ml de capacidad; el ARN, los oligonucleótidos aleatorios (random primers) y el agua libre de RNasa (tabla 1). Esta primera reacción se incubó a 70 °C por 5 min y posteriormente cada tubo se centrifugó por 10 seg para mantener el volumen original y se mantuvo en hielo (4 °C) hasta que la segunda reacción se añadiera.

Tabla 1. Componentes de la reacción 1 para la síntesis de ADNc

Reactivo	Volumen (μl)
ARN (100 ng/μl)	4.0
Oligonucleótidos aleatorios (0.5μg/ reacción)	1.0
Vf: 5.0	

Para la segunda reacción, se mezclaron los componentes enlistados en la tabla 2, a continuación ésta se añadió a la primera reacción, obteniendo así un volumen final de 20 μl. La mezcla se incubó a 25 °C por 5 min, a 42 °C por 1h y finalmente a 70 °C por 15 min. Posteriormente, los tubos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Tabla 2 Componentes de la reacción 2 para la síntesis de ADNc

Reactivo	Volumen (μl)
Agua libre de RNasa	7.0
Buffer de reacción GoScript 5X	4.0
MgCl ₂ (25 mM)	2.0
dNTP's (0.5 mM)	1.0
Transcriptasa reversa GoScript (Promega)	1.0
Vf: 15.0	

6.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de fragmentos específicos de ADN es posible mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Utilizando esta técnica, se amplificaron los fragmentos específicos de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (*SOD1* y *SOD2*), catalasas (*CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) y glutatión peroxidasa (*GPX*) y para los genes *ACT*, *UBC* y *ALG9*. Cada reacción de PCR se preparó en un tubo de polipropileno de 200 µl de capacidad integrando cada reactivo que se menciona en la tabla 3.

Tabla 3 componentes de la reacción de PCR

Reactivo	Volumen (µl)
Agua libre de RNasa (DEPC)	7.68
Buffer de la enzima (5x)	2.5
MgCl ₂ 25 mM	0.5
DNTP`s	0.5
Oligonucleótido directo	0.5
Oligonucleótido reverso	0.5
Enzima DNA polimerasa (Go Taq)	0.06
ADNc	2
	Vf= 14.24

Las reacciones de PCR se realizaron en un Termociclador (Sprint Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation), en las condiciones que se indican la tabla 4.

Tabla 4 Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de fragmentos específicos de los genes *SOD*, *CAT*, *GPX*, *ACT*, *ALG9* y *UBC6* de *Y. lipolytica*

Etapa	Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
1	Desnaturalización	95	5	1
2	Desnaturalización	95	1	} 25
	Alineamiento	60	1	
	Extensión	72	1	
3	Extensión final	72	10	1
4	Conservación	4	Infinito	

6.4 Electroforesis en geles de agarosa

El análisis de los productos amplificados mediante la reacción de PCR, se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 2.5%.

Para la preparación del gel, se pesaron 2.5 g de agarosa en una balanza de precisión (BL1500, Sartorius), la agarosa se colocó en un matraz y se disolvió con 50 ml de TAE 1x ((Tris base, ácido acético y EDTA (0.5 M, pH 8)) y después se aforó a 100 ml con buffer TAE 1X; se calentó en una placa de calentamiento (PC 420D, Corning Stirrer) para facilitar su disolución y se tomaron 20 ml de agarosa ya disuelta en un tubo de polipropileno de fondo cónico al cual se agregó 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), se homogenizó por inversión, se vertió en un molde con peine de plástico para la formación de pozos y se dejó gelificar a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó en una cámara de electroforesis horizontal que contenía TAE 1X. A continuación, se mezclaron 12 µl de los productos de PCR con 2 µl de buffer de carga azul de bromofenol 6X

(0.25 % azul de bromofeno y 40 % de sucrosa) y se depositaron en los pozos del gel con micropipeta.

Para la separación de las bandas se aplicó una corriente eléctrica de 90 Volts durante 40 min con una fuente de poder Power pack 300 (Bio Rad), al finalizar, el gel se visualizó con luz UV en un sistema de fotodocumentación (UVP). El tamaño de las bandas correspondiente a los productos amplificados se identificó comparándolo con el marcador de peso molecular HyperLadder IV (Bioline) y posteriormente, utilizando funciones del software se seleccionó el área de cada banda para obtener, por densitometría, los valores numéricos que permitieran la cuantificación del producto amplificado.

6.5 Análisis de resultados

Los datos obtenidos por densitometría de los productos de PCR, se procesaron con el software estadístico SPSS versión 21.0 para Windows y Excel 2013 para Windows. Para el análisis de las diferencias estadísticas se utilizó la prueba t-Student y se consideró significativo cuando el valor de p obtenido fue ≤ 0.05

7 RESULTADOS

7.1 Identificación de las fases de crecimiento de *Y. lipolytica*

Para determinar la obtención de las células jóvenes y envejecidas de *Y. lipolytica* fue necesario el monitoreo de la densidad óptica (OD_{600nm}) de los cultivos celulares; cada medición se hizo por triplicado con un intervalo de 2 h hasta las 96 h, los valores obtenidos se promediaron y se graficaron. Los datos obtenidos indican que la cepa P01A de *Y. lipolytica* se encuentra en fase de adaptación durante las primeras 6 h, en fase de crecimiento exponencial o logarítmico (células jóvenes) entre las 6-24 h de incubación y en fase estacionaria (envejecidas) después de las 24 h (Fig.3). Se usaron las células jóvenes y envejecidas para el resto del trabajo.

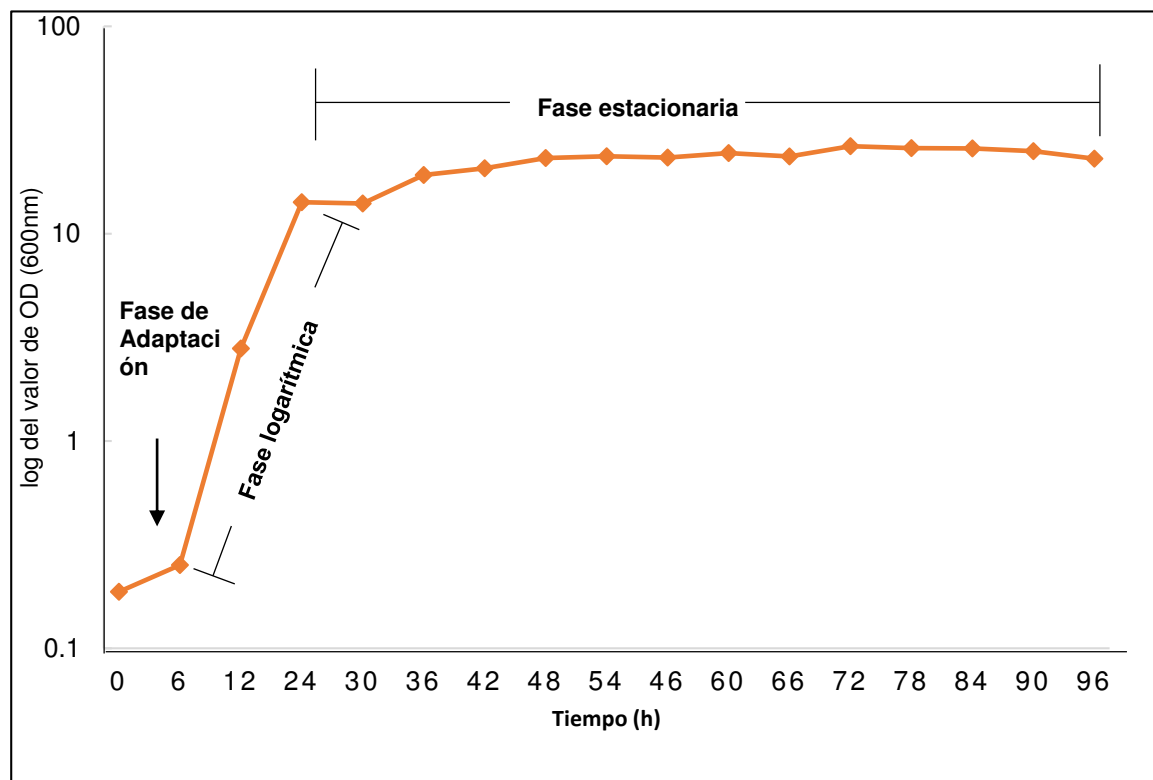


Figura 3. Curva de crecimiento de *Y. lipolytica* en condiciones normales de cultivo. Las células *Y. lipolytica* (cepa P01A) se incubaron a 28 °C y 200 rpm en un matraz Erlenmeyer con 50 ml de medio YPD. Los valores de OD (600nm) se determinaron en los tiempos indicados en la gráfica. En la parte superior se indican las fases de crecimiento identificadas hasta las 96 h de incubación.

7.2 Identificación *in silico* de secuencias de los genes constitutivos y de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica*; diseño de oligonucleótidos específicos.

El análisis *in silico* permitió la identificación de los genes que presuntamente pueden ser utilizados como constitutivos: *ALG9* y *UBC6*; el primer gen codifica una enzima que cataliza la transferencia de grupos manosa a oligosacáridos ligados a lípidos (ubiquitina), y la segunda codifica una enzima que cataliza la unión covalente de ubiquitina a otras proteínas (manosil transferasa). En un trabajo previo de este grupo de investigación ya se había identificado la secuencia del gen *ACT*, y de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes: 3 que codifican catalasas, 2 para superóxido dismutasa y 1 para glutatión peroxidasa. Sobre estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos específicos para las regiones codificantes de los genes de defensa antioxidante (tabla 5).

Para conocer la especificidad y estandarizar las condiciones de amplificación de los oligonucleótidos diseñados para *UBC6* y *ALG9*, se realizaron reacciones de PCR sobre ADN genómico de *Y. lipolytica* a diferentes temperaturas (58 a 66 °C). En la figura 4 se muestran las temperaturas óptimas de amplificación: 60 y 64 °C. Considerando que la temperatura de amplificación del de *ACT* ya estaba previamente estandarizada a la temperatura 60 °C. Por lo tanto, se decidió amplificar los fragmentos a 60 °C.

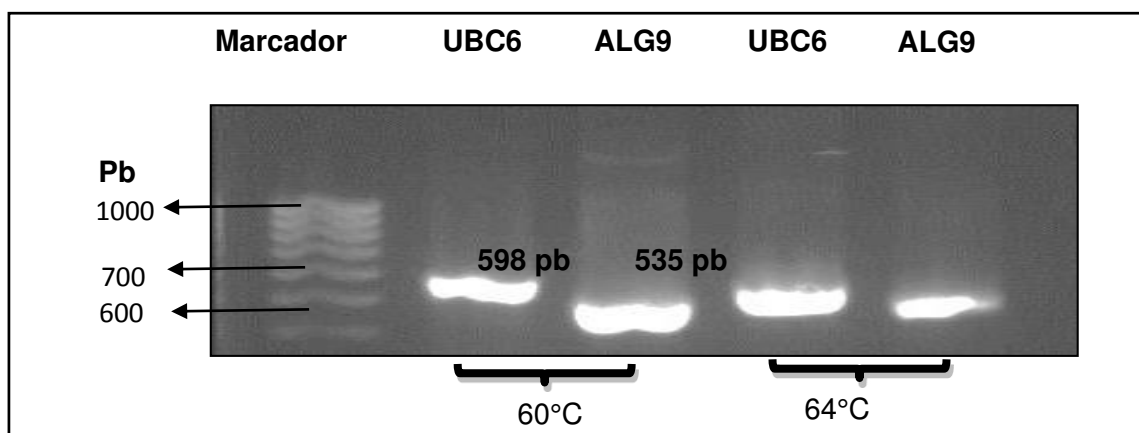


Figura 4. Análisis de los productos de PCR de los fragmentos de los genes constitutivos, utilizando ADN genómico de *Y. lipolytica*, probados a diferentes temperaturas. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, Marcador HyperLadder IV. Pb= pares de bases.

Tabla 5. Características de los genes y primers usados para el análisis de expresión: *ACT*, *ALG9*, *UBC6*, *CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *SOD1*, *SOD2*, y *GPX*

Gen	Identificación del gen	Secuencia de oligonucleótidos (5' → 3')	Amplicón (pb)	Temp (°C)
<i>ACT</i>	YALI0P08272g	F: GGTATCGTTCTTGACTCTGGTGATGG R: GGCCTCGTCGTACTCCTGCTTGG	692	60
<i>ALG9</i>	YALI0E28941g	F: CCGGCGACTTTTGCATACTGTGCC R: CCAGCAACAGCAATGAGCACAAAGCC	535	60
<i>UBC6</i>	YALI0E30173g	F: CCGCGAAACCAGCAGAGAACAATCTCC R: CCGAGGAATCTAGCTGCCACAATCC	598	60
<i>CAT1</i>	YALI0E34265g	F: CCACCACCGTGCGATTTTCTACC R: CATGGTCTGAAGGGAAACGGTCC	539	60
<i>CAT2</i>	YALI0E34749g	F: CCATGCAAAGGGAGGAGGAGCC R: CCGTCCACGAGGGGTAATCCC	623	60
<i>CAT3</i>	YALI0F30987g	F: CAAGACCTTCACTCGATTCTCCACC R: CGTCATTGGTGAGGTTCTTGATGCC	425	60
<i>SOD1</i>	YALI0F30877g	F: CACTGGAACCTTCTGCTCCGTCCC R: CTGGACGTCCTTTCGCTCCTCC	547	60
<i>SOD2</i>	YALI0E12133g	F: CTTGAGGAGATTCCAAGGTCTCC R: CTTGAGAGAGTCGGCATGGCC	390	60
<i>GPX</i>	YALI0E02310g	F: CCGCTTTCTACAACCTCGCTCC R: CGACGTTACCGTGCTTATCAACC	411	60

La identificación de cada gen fue obtenida del consorcio francés, Génolevures. Amplicón: tamaño del fragmento de ADN/ARN que corresponde al gen amplificado. La temperatura de alineamiento corresponde a cada par de primer, la cual se determinó a partir de nuestros ensayos experimentales.

7.3 Obtención de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y tratamiento con DNasa.

Se cosecharon cinco lotes de cultivos independientes de células jóvenes y envejecidas de *Y. lipolytica* tratadas con H_2O_2 (4.5 mM). La extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN) se realizó a partir de los paquetes de células jóvenes y envejecidas, y para comprobar la extracción y calidad, se realizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (Fig.5) y mediante espectrofotometría se cuantificó la concentración y pureza de los ácidos nucleicos, considerando que los valores deben estar entre 1.8 -2.2 en la relación de lectura entre la DO 260/280 nm. Posteriormente, el ADN genómico se eliminó con la enzima DNasa, y la eficiencia de esta se determinó mediante PCR, como se indica en la figura 6, donde se observa que en las muestras tratadas con DNasa no hubo producto de amplificación, lo que indica que el ADN genómico ha sido eliminado completamente. El ARN resultante del tratamiento con DNasa, se sometió a la acción de la enzima transcriptasa reversa para obtener una plantilla de ADNc y a partir de esta determinar la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes.

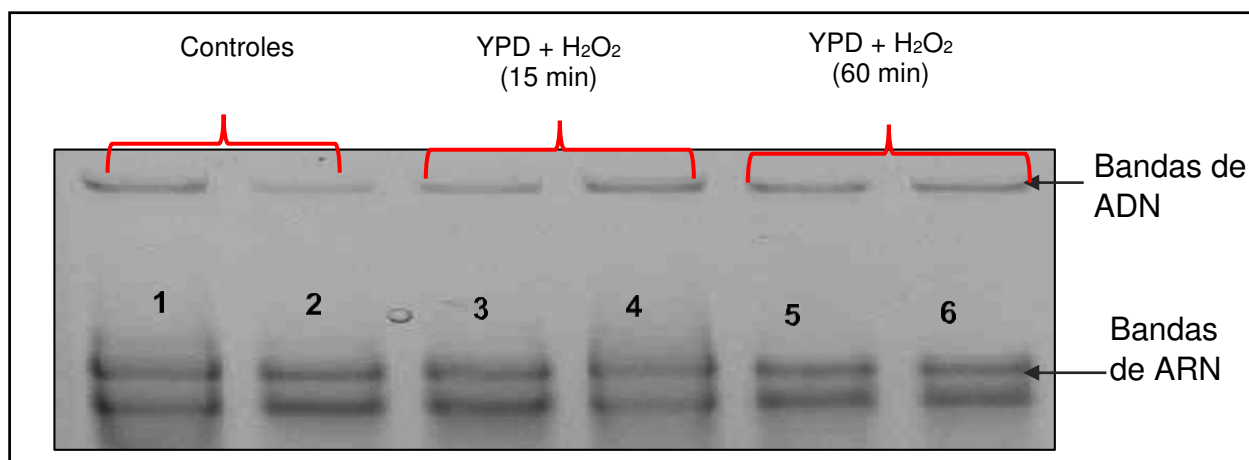


Figura 5. Ácidos nucleicos extraídos de células sometidas a diferentes tratamientos. Controles= ácidos nucleicos de células sin tratamiento, YPD + H_2O_2 (4.5 mM)= ácidos nucleicos de células sometidas a estrés oxidativo. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7%; en la parte superior de los carriles se observa la banda correspondiente al ADN genómico y en la parte inferior, las bandas correspondientes al ARN. 1, 3 y 5 corresponden a células jóvenes y 2, 4 y 6 a células envejecidas.

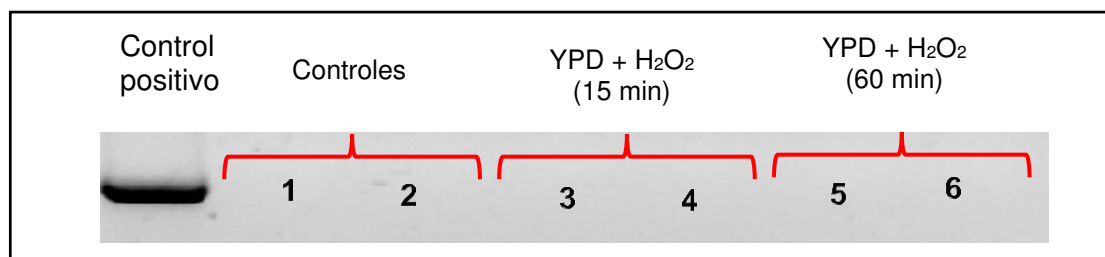


Figura 6. PCR sobre tratamientos con DNasa. A la izquierda se muestra el control positivo que representa a los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Las muestras 1,3 y 5 corresponden al tratamiento con DNasa de las células jóvenes mientras que las muestras 2,4 y 6 al tratamiento con DNasa de las células envejecidas. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

7.4 Análisis de la expresión de posibles genes constitutivos en células de *Y. lipolytica* bajo condiciones de EO: *ACT*, *ALG9* y *UBC6*.

Para analizar los cambios en la expresión de los genes constitutivos en *Y. lipolytica*, se partió de muestras de ADNc obtenidas de células tratadas durante 1 h con diferentes agentes oxidantes y antioxidantes (H_2O_2 , 4.5 mM; menadiona, 0.1 mM y ácido gálico, 2 mM).

Los experimentos de expresión se realizaron por cuadruplicado. La expresión de los genes *ALG9* y *UBC6* en los distintos tratamientos no presentó cambios estadísticamente significativos, y aunque actina tuvo diferencias en su nivel de expresión este no fue estadísticamente significativo (tabla 6 y figura 7). Para éste estudio se decidió utilizar el gen *UBC6* como gen constitutivo.

Tabla 6. Análisis comparativo de la expresión de los genes constitutivos: *ACT*, *ALG9* y *UBC6* de células de *Y. lipolytica* sometidas al efecto de diferentes agentes oxidantes.

GEN	YPD	H ₂ O ₂	GAL	MEN	<i>p</i>
<i>ACT</i>	0.60±0.5	0.43±0.6	0.40±0.2	0.77±0.3	0.7
<i>ALG9</i>	2.10±1.6	2.55±3.6	2.55±5.5	0.9553±0.6	0.7
<i>UBC6</i>	0.62±0.3	0.69±0.3	0.5±0.4	0.52±0.3	0.9

Promedios de 4 experimentos individuales ± desviaciones estándar (DE). Células de *Y. lipolytica* en fase logarítmica cultivadas en medio YPD sometidas durante 1 h a EO por efecto de H₂O₂ (4.5 mM), Ácido gálico (2 mM) y Menadiona (0.1 mM). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba estadística ANOVA.

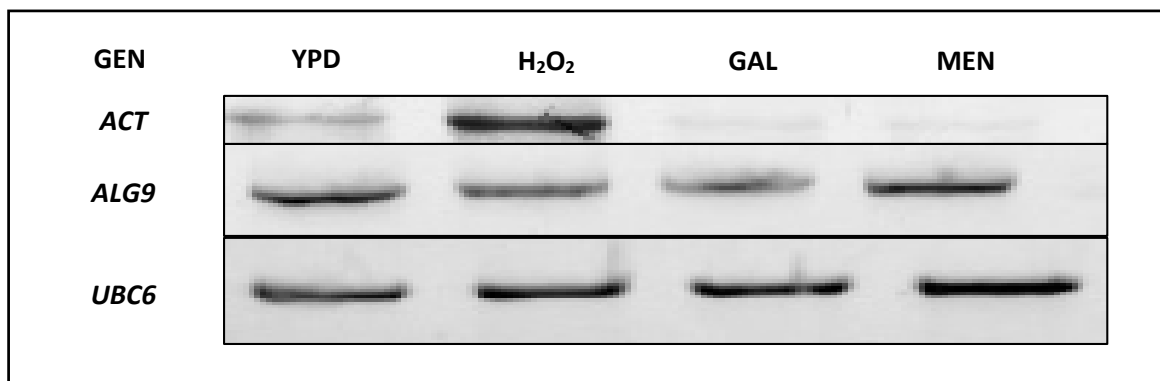


Figura 7. Comparación de los niveles de expresión de los genes *ACT*, *ALG9* y *UBC6* en células de *Y. lipolytica* sometida a condiciones de estrés oxidativo (ver leyenda de la tabla 6). Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

7.5 Análisis de expresión de los genes *CAT*, *SOD* y *GPX* en células de *Y.lipolytica* sometidas a estrés oxidativo.

En base al análisis de los resultados de los genes constitutivos, se decidió utilizar el gen *UBC6* como gen control para normalizar nuestros resultados de expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes en *Y. lipolytica*. El ADNc que se obtuvo a partir de las muestras de ARN se ajustó a una concentración de 200 ng/μl y se utilizó como plantilla para amplificar los fragmentos de los genes de interés, usando los oligonucleótidos específicos diseñados sobre las secuencias de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes de *Y. lipolytica*. En la figura 8 se muestran las bandas correspondientes a los productos de RT-PCR de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes; se puede notar que la expresión en la mayoría de los genes es mayor en muestras correspondientes a células envejecidas, es más intensa a los 15 que a los 60 min de tratamiento con H₂O₂, lo cual es un indicador cualitativo de la respuesta celular al EO generado por el H₂O₂.

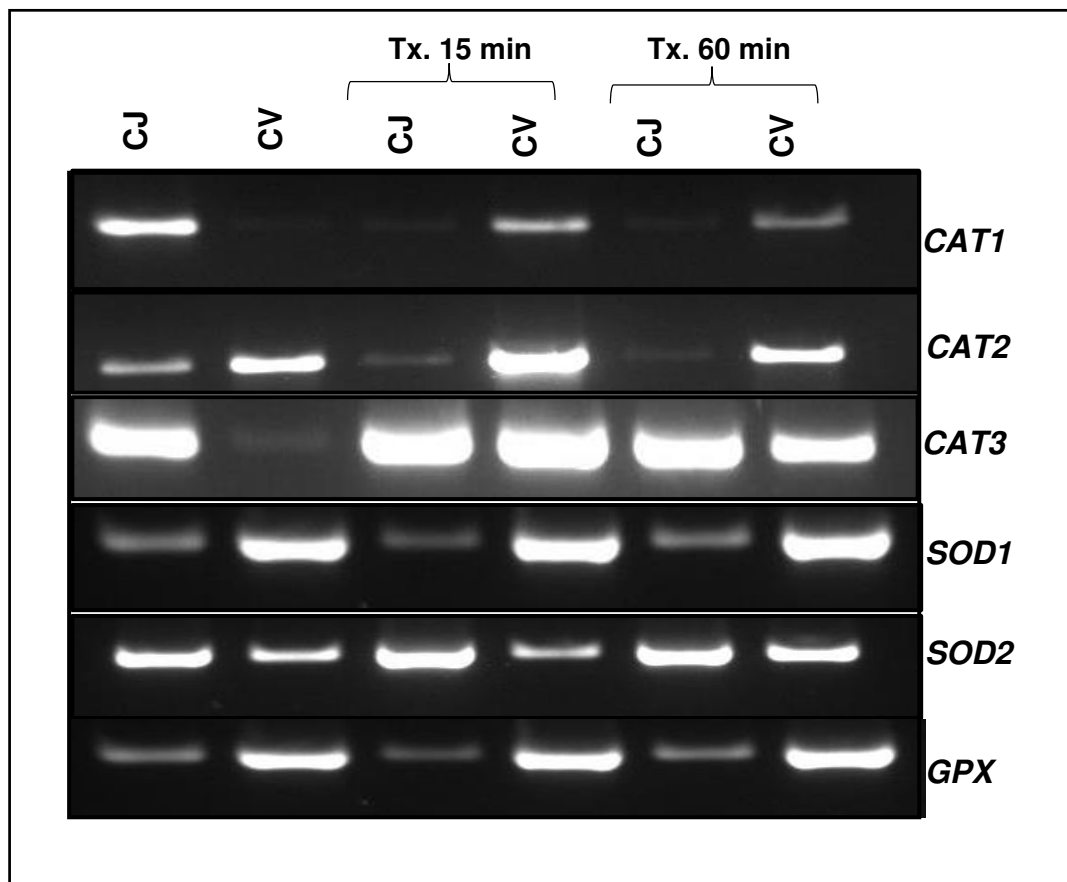


Figura 8. Imagen representativa de los productos de RT-PCR obtenidos para cada gen. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa (2.5%). En cada uno de los experimentos se incluyó el gen *UBC6* (constitutivo), lo que permitió ajustar los resultados. CJ: células jóvenes, CV: células envejecidas, CJTx, CVTx: células jóvenes y envejecidas tratadas con H_2O_2 15 y 60 min. Los tamaños de las bandas correspondientes a cada gen son los indicados en la tabla 5.

El efecto del agente oxidante H_2O_2 sobre la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes en células de *Y. lipolytica* (jóvenes y envejecidas) se analizó mediante los valores obtenidos de la densitometría correspondiente a cada banda (Tabla 7). Los datos obtenidos se ajustaron con respecto a la expresión del gen constitutivo (*UBC6*) y se determinó el cambio (número de veces) con respecto a la expresión del mismo gen en las células control (cultivos en YPD sin agente oxidante).

Tabla 7. Comparación entre tratamientos con respecto al control del Incremento de la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes.

Tx	Grupo	Gen					
		<i>CAT1</i>	<i>CAT2</i>	<i>CAT3</i>	<i>SOD1</i>	<i>SOD2</i>	<i>GPX</i>
YPD	C.C. Jóvenes	7.54±6.4	11.66±3	7.2±2	0.51±0.1	14.9±1.5	9.18±6.3
H_2O_2	C.J. Tx 15 min	1.11±0.96	1.51±0.47	2.6±1	1.7±1.3	1.25±0.	2.2±1.3
	C.J. Tx 60 min	0.46±0.41	1.19±0.50	2.0±0.8	3.3±1.4	0.9±0.2	2.1±1.4
YPD	C.C.Envejecidas	0.65±0.6	5.83±2.5	0.5±0.3	0.29±0	9.6±2	3.17±1.1
H_2O_2	C.V. Tx 15 min	3.53±5.17	2.79±1.71	51.2±41.8	11.0±7.8	1.3±0.5	2.7±1.4
	C.V. Tx 60 min	2.29±3.58	1.4±0.6	30.8±23.3	3.61±0.5	0.6±0.3	1.9±1.1

n=5; promedio+DE C.J: células control jóvenes, CV: células envejecidas, C.J.Tx= células jóvenes C.V.Tx= envejecidas con tratamiento 15 y 60 min.

El análisis de expresión de los genes en células control (cultivadas en medio YPD sin tratamiento oxidante) mostró que los niveles de expresión de todos los genes son mayores en las células jóvenes que en las células envejecidas. En las células envejecidas los genes *CAT3* y *SOD2* mostraron un incremento significativo en sus niveles de expresión ($p<0.05$) (Fig. 9).

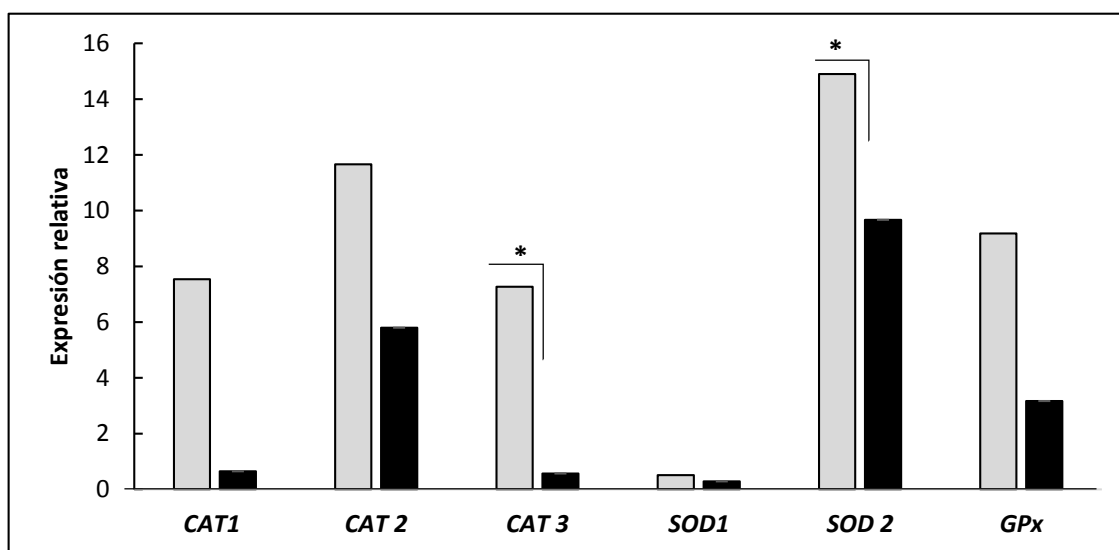


Figura 9. Expresión basal de los genes de respuesta antioxidante. Células cultivadas en condiciones normales (YPD sin tratamiento). Las barra grises corresponden a células jóvenes y las barras negras corresponden a células envejecidas. Los grupos diferentes están representados con $*p<0.05$

Cuando las células se sometieron a EO por efecto del H₂O₂ hubo un incremento en la expresión de los genes de respuesta antioxidante en ambas poblaciones celulares, observándose que dicho incremento fue mayor en las células envejecidas. En ambos grupos celulares se observó que hubo un mayor incremento en la expresión de los genes durante los primeros 15 min de tratamiento, con un incremento mayor en las células envejecidas, mayoritariamente los genes *CAT3* y *SOD1* (* $p \leq 0.05$). Por el contrario la expresión de los genes *CAT1*, *CAT2*, *SOD2* y *GPX* no mostró incrementos significativos. A los 60 min de tratamiento con H₂O₂ la expresión de la mayoría de los genes alcanzó valores semejantes a los basales, a excepción del gen *CAT3* cuya sobreexpresión se mantuvo ~30 veces con respecto al valor basal (Fig.10).

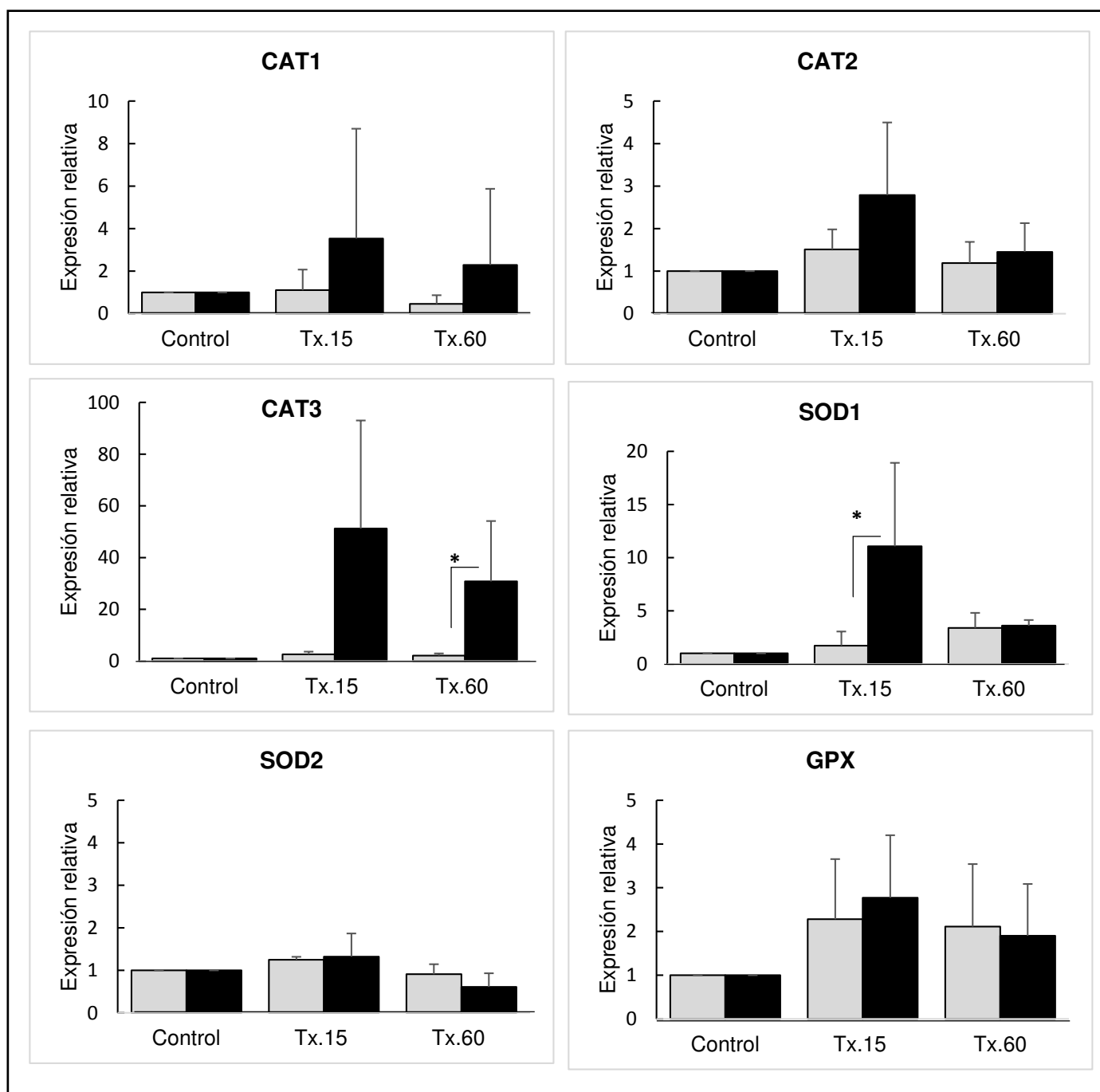


Figura 10. Comparación de los niveles de expresión de los diferentes genes de respuesta antioxidante en células jóvenes y envejecidas, a diferentes tiempos (15 y 60) min de tratamiento con H_2O_2 (4.5 mM). Las barras grises corresponden a las células jóvenes y las barras negras a las células envejecidas. La expresión relativa de cada gen se representa en número de veces con respecto al control (células cultivadas en medio YPD sin tratamiento). Los valores que se muestran corresponden al promedio \pm desviaciones estándar (SD) de 5 experimentos independientes. El análisis comparativo se realizó con la prueba estadística t-Student. Los tiempos de tratamiento que resultaron diferentes ($p \leq 0.05$) se indican con un asterisco.

7.6 Análisis de expresión de los genes que codifican para catalasas de *Y. lipolytica* sometida a estrés oxidativo.

A partir del análisis de expresión de los genes que presuntamente codifican para catalasas de *Y. lipolytica*, se observó que la expresión se incrementa a los 15 min de tratamiento con H_2O_2 en ambos grupos celulares; aunque en las células jóvenes la expresión no tiene un incremento significativo con respecto al grupo control (células en YPD sin tratamiento oxidante). En las células envejecidas se muestra que tanto a los 15 como a los 60 min de tratamiento con H_2O_2 la expresión de los genes *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* fue mayor en comparación al grupo control y mayor que en las células jóvenes. La expresión del gen *CAT3* aumentó ~51 veces con respecto al grupo control y ~48 veces con respecto a las células jóvenes, sin embargo, dicha expresión no mostró diferencia estadística. A los 60 min de tratamiento, la expresión de la mayoría de los genes tomó valores semejantes a los basales, a excepción del gen *CAT3* cuya expresión se mantuvo aumentada (~30 veces) con respecto al valor basal (Fig. 11)

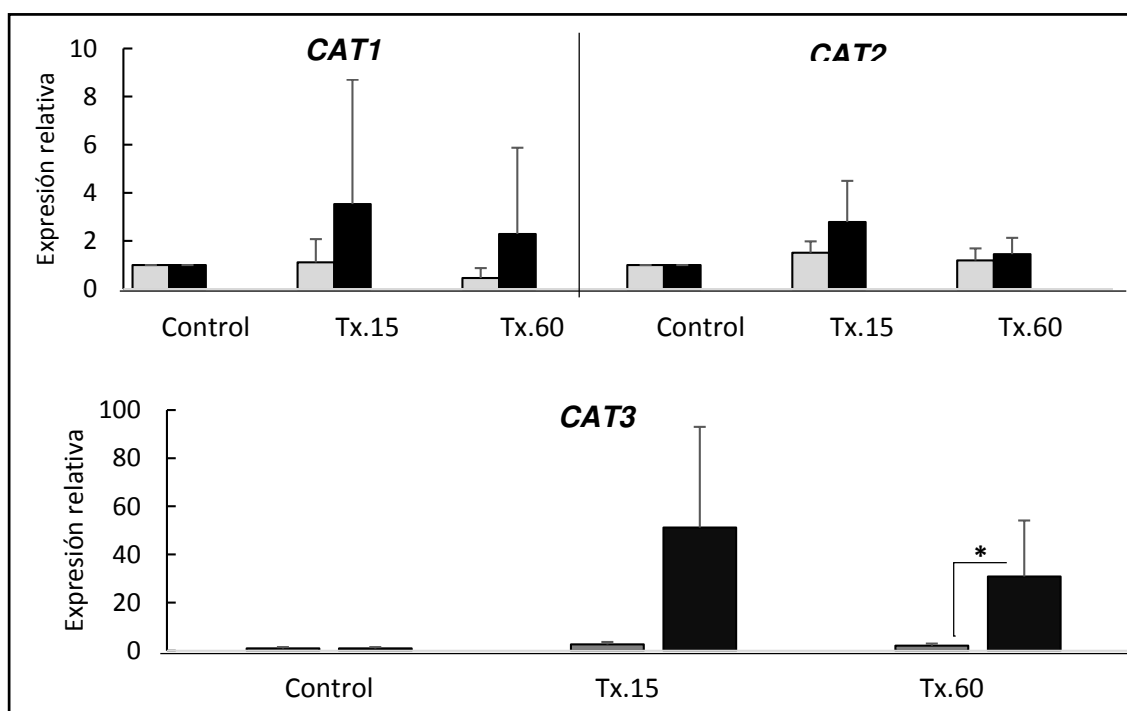


Figura 11. Comparación de los niveles de expresión de los genes *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* en células jóvenes (barras de color gris) y envejecidas (barras de color negro) de *Y. lipolytica* sometidas a diferentes tiempos (15 y 60 min) a condiciones de estrés oxidativo. Los niveles de expresión están indicados en número de veces con respecto al gen control (YPD). Los valores que se muestran corresponden al promedio \pm desviaciones estándar (SD) de 5 experimentos independientes. El análisis comparativo se realizó con la prueba estadística t-Student. Los niveles de expresión que resultaron diferentes ($p \leq 0.05$) se indican con un asterisco (*).

7.7 Análisis de la expresión de los genes SOD1 Y SOD2 de células de *Y. lipolytica* sometidas a condiciones de estrés oxidativo.

La expresión de los genes que presuntamente codifican para las enzimas superóxido dismutasas se incrementó durante los primeros 15 min de tratamiento con H_2O_2 , tanto en células jóvenes como en envejecidas; dichos niveles se redujeron a los 60 min (semejante a los niveles basales). En comparación con las células jóvenes, en las células envejecidas el H_2O_2 tuvo un mayor efecto sobre el gen *SOD1*, ya que éste incrementó su expresión ~12 veces (* $p<0.05$) a los 15 min de tratamiento. El gen *SOD2* no mostró cambios significativos en su nivel de expresión (Fig. 12)

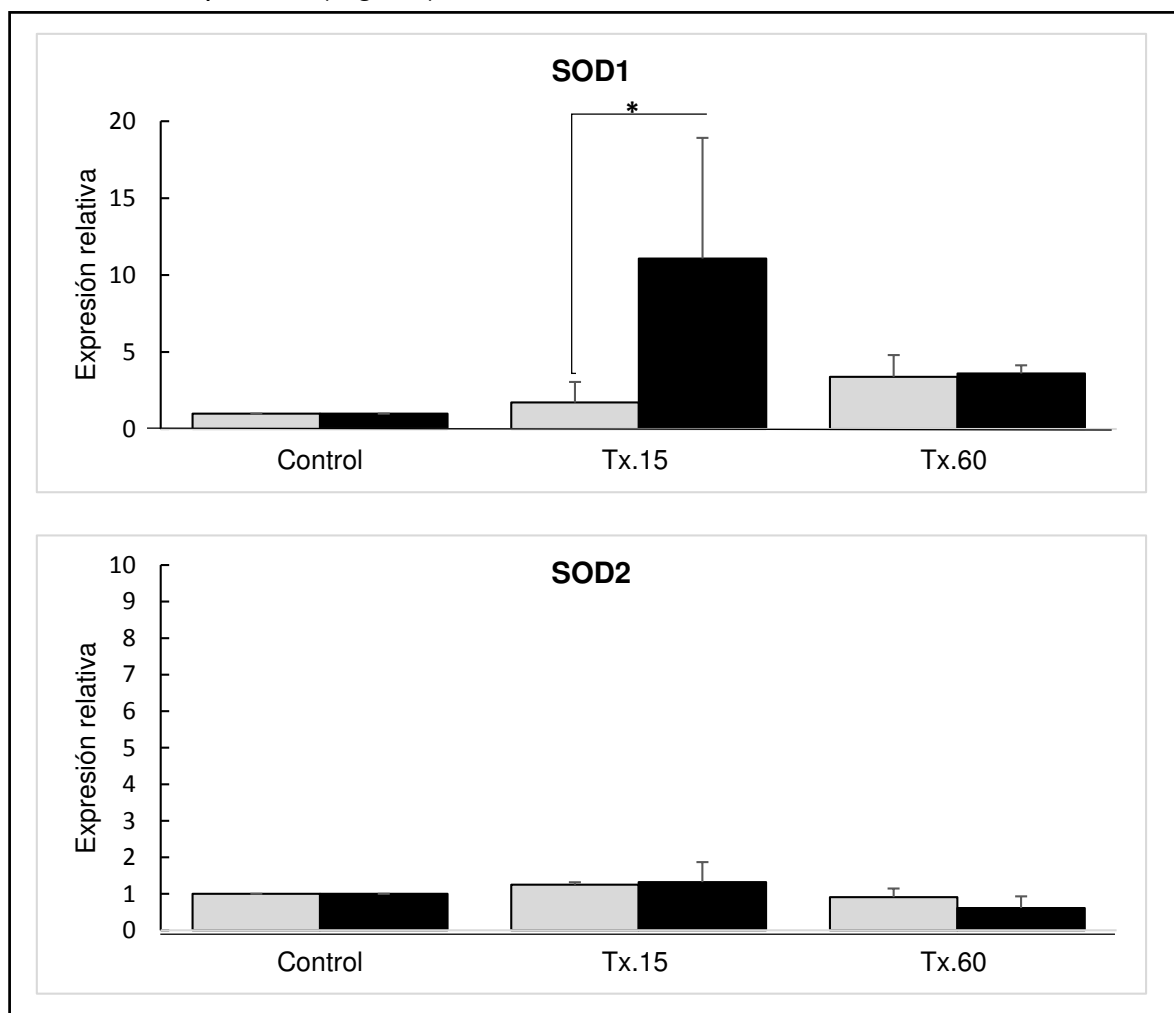


Figura 12. Comparación de los niveles de expresión de los genes *SOD1* y *SOD2* en células jóvenes (barras de color gris) y envejecidas (barras de color negro) de *Y. lipolytica* sometidas a diferentes tiempos (15 y 60 min) a condiciones de estrés oxidativo. Los niveles de expresión están indicados en número de veces con respecto al gen control (YPD). Los valores que se muestran corresponden al promedio \pm desviaciones estándar (SD) de 5 experimentos independientes. El análisis comparativo se realizó con la prueba estadística t-Student. Los tiempos de tratamiento que resultaron diferentes ($p \leq 0.05$) se indican con un asterisco (*).

7.8 Análisis de la expresión del gen *GPX* en *Y. lipolytica* bajo condiciones de estrés oxidativo.

La expresión del gen que presuntamente codifica para una glutatión peroxidasa de *Y. lipolytica*, mostró un patrón de expresión similar a los otros genes analizados, incrementando su expresión a los 15 min y disminuyendo a los 60 min. Aunque no hubo cambios estadísticamente significativos, se observa una tendencia a incrementar su expresión en las células envejecidas más que en las células jóvenes, en respuesta al tratamiento oxidante (Fig. 13).

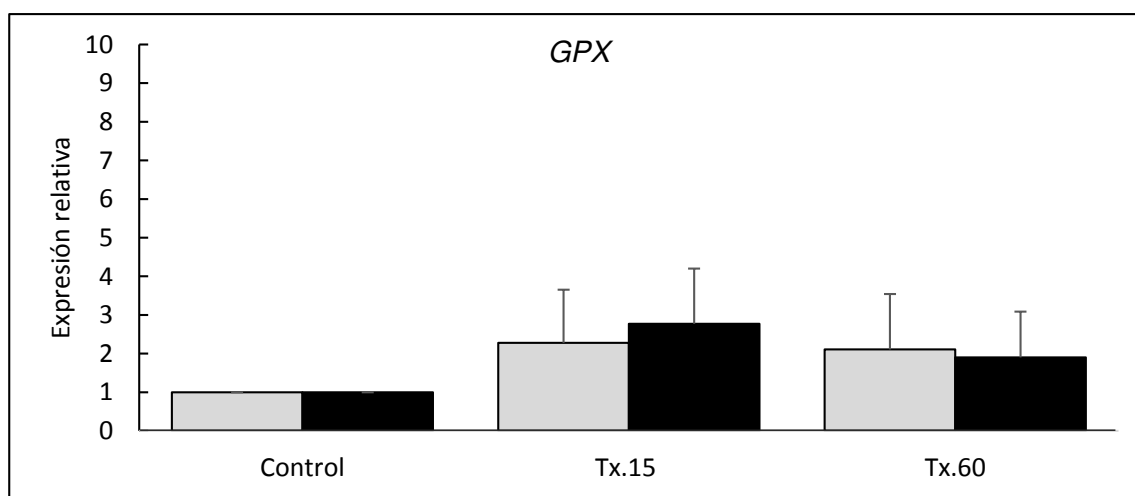


Figura 13. Comparación de los niveles de expresión de los genes *GPX* en células jóvenes (barras de color gris) y envejecidas (barras de color negro) de *Y. lipolytica* sometidas a diferentes tiempos (15 y 60 min) a condiciones de estrés oxidativo. Los niveles de expresión están indicados en número de veces con respecto al gen control (YPD). Los valores que se muestran corresponden al promedio \pm desviaciones estándar (SD) de 5 experimentos independientes. El análisis comparativo se realizó con la prueba estadística t-Student.

8 DISCUSIÓN

8.1 Expresión de genes constitutivos de células de *Y. lipolytica* sometidas a condiciones de estrés oxidativo: *ACT*, *ALG9* y *UBC6*

Los genes “constitutivos o housekeeping” cumplen el criterio de que su expresión no sufre cambios, independientemente de la condición experimental. Por lo que, generalmente se usan como controles de diferentes condiciones experimentales; aunque, se ha demostrado que estos genes están regulados en cierta medida. Esto podría sugerir que no existe un gen de referencia cuyo nivel de expresión se mantenga siempre constante. Por esta razón es fundamental la selección cuidadosa de un conjunto de genes que muestren una variación mínima en diferentes condiciones biológicas.

El gen que codifica para la proteína actina, uno de los genes de mayor uso como gen constitutivo en biología molecular ha sido cuestionado por diferentes investigadores (Celińska & Grajek, 2013; Dulermo, Gamboa-Meléndez, Dulermo, Thevenieau, & Nicaud, 2014; Guo, Madzak, Du, Zhou, & Chen, 2014; Lazar, Walczak, & Robak, 2011; Yin, Madzak, Du, Zhou, & Chen, 2012). Wenzel y Steensma (1995) reportaron que la concentración del RNAm del gen de *ACT* procedente de células envejecidas es menor en comparación al que procede de células jóvenes, es decir; el nivel del mRNA de *ACT* no es constante, poniendo así en peligro su función como un gen constitutivo. Con base a lo anterior, podría cuestionarse si la transcripción de *ACT* es constitutiva en las diferentes fases de crecimiento celular y representar al mismo tiempo un serio problema en experimentos cuando se utilizan muestras de cultivo en fase estacionaria (envejecidas). Teste et al., (2009) invalidaron el uso de *ACT* como gen constitutivo, ya que presentó mayor variabilidad que el conjunto de genes

probados (UBC6, TAF10, ALG9, TFC1, KRE11, FRP2) cuando las células de *S.cerevisiae* se sometieron a temperaturas altas de crecimiento.

En otro estudio en donde se sometieron células de *Y. lipolytica* a EO por efecto de diferentes agentes oxidantes (H₂O₂, menadiona y ácido gálico), se observaron cambios en los niveles (Desentis et al., 2015).

La actina del citoesqueleto de las levaduras es un blanco importante de ERO, cuando hay daño en la secuencia *ASC1* se produce un hiperensamblado en los filamentos de actina que tiene como consecuencia defectos morfológicos e incremento en la sensibilidad de la actina al EO. La disminución de la dinámica de la actina y la desestabilización del citoesqueleto es inducida por proteínas Sla1p y End3p que provocan acumulación de ERO y muerte celular por activación de la vía Ras/cAMP quinasa (Farrugia & Balzan, 2012)

Para realizar el presente trabajo, fue necesario determinar el uso de un gen constitutivo que permitiera normalizar los resultados, por lo que se determinó la estabilidad de los genes *ACT*, *ALG9* y *UBC6* de *Y. lipolytica* en diferentes concentraciones de agentes oxidantes: H₂O₂ (4.5 mM), menadiona (0.1 mM) y ácido gálico (2mM). Aunque las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas, se observó que el gen *ACT* presenta cambios en su nivel de expresión, el cual aumenta cuando la célula está bajo los efectos oxidantes del H₂O₂ y disminuye en presencia de menadiona y ácido gálico. Al mismo tiempo se evaluó la estabilidad de la expresión de los genes *ALG9* y *UBC6*, y éstos mostraron ser más homogéneos que el gen *ACT* en células de *Y. lipolytica* cuando fueron sometidas a EO. Los resultados indican que tanto el gen *ALG9* y *UBC6* pueden ser utilizados como genes constitutivos en *Y. lipolytica*. Algunos autores han indicado que los genes *UBC6* y *ALG9* pueden ser útiles como genes constitutivos en el análisis de expresión de genes en levaduras (Llanos, François, & Parrou, 2015; Nadai, Campanaro, Giacomini, & Corich, 2015; Teste et al., 2009)

8.2 Expresión de los genes *CAT*, *SOD* y *GPX* en células jóvenes y envejecidas de *Yarrowia lipolytica*.

Durante el ciclo de vida celular se van acumulando agentes oxidantes que producen daño oxidativo y una disminución en el mecanismo de defensa antioxidante (Jakubowski, Biliński, & Bartosz, 2000). En *S. cerevisiae* se ha visto que existe una pérdida gradual de la actividad de la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa mientras las células progresan hacia el envejecimiento, mientras que las catalasas no presentan cambios (Grzelak, Skierski, & Bartosz, 2001). En nuestro diseño experimental, la expresión de los genes que codifican para enzimas antioxidantes en las células envejecidas (incubadas durante 4 días) sin tratamiento (YPD), fue menor en comparación a las células jóvenes, en estas últimas los genes que codifican para las catalasas y el gen que codifica Sod2 fueron los que mayoritariamente se expresaron. El EO generado por las propias células envejecidas podría estar induciendo una capacidad adaptativa de las células. Por lo que la expresión de los genes en las células envejecidas no muestra incrementos significativos.

8.3 Genes de respuesta antioxidante en *Y. lipolytica*: CAT, SOD y GPX.

La regulación transcripcional es la clave para coordinar la activación de muchos genes que extienden la vida útil y que afectan el envejecimiento. En *C. elegans* las vías que regulan el crecimiento celular, el envejecimiento y la respuesta al EO pierden funcionalidad a medida que éste envejece (Tepper et al., 2013). Steinhagen-Thiessen (1981) documentó que el EO suprime la transcripción de genes involucrados en diferentes procesos celulares y más aún, cuando las células están en estado senescente los mecanismos de defensa antioxidante se vuelven ineficientes. Ahora sabemos que los mecanismos de respuesta antioxidante se activan gradualmente y son dependientes del tipo celular, del carácter espacio-temporal del estímulo, y del tipo y concentración de ERO (Bar-Shai, Carmeli, Ljubuncic, & Reznick, 2008). En células de *S. cerevisiae* tratadas con 0.5 mM y 0.25 mM de H₂O₂ por 30 min, hubo un incremento en la actividad de las catalasas y las superóxido dismutasas en comparación con los controles (Bařliak, 2006), mientras que a concentraciones más altas de H₂O₂ (54 mM) la actividad de Sod es inhibida (Jakubowski et al., 2000). Otros autores han reportado que la actividad de las enzimas antioxidantes es diferente según la etapa de crecimiento celular de *S. cerevisiae*: en células jóvenes se observó que la actividad de las catalasas, superóxido dismutasas y glutatión peroxidadas podría no ser necesaria para la eliminación del H₂O₂, mientras que en células envejecidas estas enzimas presentan un incremento en su actividad (Grzelak et al., 2006). En células de *Y. lipolytica* tratadas con H₂O₂ (120 mM), menadiona (0.5 mM) y juglona (0.03 mM) se encontró que en las células jóvenes se inhibió el crecimiento celular, y que por el contrario las células envejecidas fueron más resistentes a los tratamientos (Biriukova, 2006).

Lopes et. al.,(2013) expusieron células de *Y. lipolytica* y de *P. pastoris* a estrés inducido por H₂O₂, paraquat y calor y observaron que en *Y. lipolytica* la enzima con mayor actividad fue la catalasa seguida de superóxido dismutasa. En un experimento más reciente, se observó que las células envejecidas de *Y. lipolytica* sometidas a EO por efecto del H₂O₂ la actividad de las enzimas catalasas, superóxido dismutasas y glutatión peroxidasas se incrementó hasta tres veces más que en las células jóvenes (Arinbasarova, Biryukova, & Medentsev, 2015).

Nuestros hallazgos muestran que la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes, en células de *Y. lipolytica* sometidas a EO (H₂O₂, 4.5 mM), fue mayor en células envejecidas en comparación con las células jóvenes. En las células jóvenes los genes que codifican para las catalasas no tienen un incremento significativo en su expresión comparándolos con los niveles basales. Interesantemente en las células envejecidas, el gen que codifica para CAT3 se expresó más que todos los genes, incluso mayor que en las células jóvenes, hasta ~50 veces más. En *Y. lipolytica* CAT3 podría tener un papel principal en la protección contra agentes oxidantes durante el envejecimiento celular. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Lopes et. al.,(2013) y Arinbasarova et al., (2015) quienes encontraron que la actividad de las catalasas incrementa cuando las células de *Y. lipolytica* se someten a tratamiento con H₂O₂, lo que sugiere fuertemente que la regulación de las catalasas se lleva a cabo al nivel transcripcional.

Con respecto a las superóxido dismutasas, Kirchman, Kim, Lai, & Jazwinski (1999) describieron que la enzima Cu-ZnSOD (SOD1) en *S. cerevisiae* se sobreexpresó en las células envejecidas, mientras que la expresión de MnSOD (SOD2) disminuyó durante el ciclo de vida de *S. cerevisiae* (Fabrizio, Pletcher, Minois, Vaupel, & Longo, 2004). En nuestro estudio, encontramos que el gen SOD1, que codifica para una sod1 citoplasmática, tuvo un incremento significativo (~12 veces más) ($p \leq 0.05$) en su nivel de expresión cuando las células de *Y. lipolytica* se sometieron a EO con H_2O_2 (4.5 mM), comparado con los niveles basales, sin embargo; este incremento se observó sólo en células envejecidas. Tsang, Liu, Thomas, Zhang, y Zheng., (2014) han reportado una nueva función de sod1: este puede estar actuando también como factor de transcripción nuclear para regular la respuesta al H_2O_2 .

En el envejecimiento la presencia de las superóxido dismutasas adquieren gran importancia, ya que se ha visto que las mutantes de SOD1 son menos viables que las mutantes de SOD2 en células de *S. cerevisiae* envejecidas (Longo et al., 1996) y se han reportado resultados similares en bacterias como *Escherichia coli* y *Rhodobacter capsulatus* (Hochman, Figueredo, & Wall, 1992; Li & Clarke, 1992)

González-Párraga et. al., (2010b), sometieron células de *C. albicans* a EO utilizando diferentes concentraciones de H_2O_2 (0.5 y 50 mM) y demostraron que, a concentraciones altas de H_2O_2 se induce la expresión de las SODs. Por lo que los autores concluyen que el patrón de actividad es dependiente de la dosis del agente oxidante. De la misma manera, se ha visto que la exposición de las células a concentraciones moderadas de H_2O_2 activa a la enzima SOD1 citoplasmática (Cu-ZnSOD) y a concentraciones potencialmente tóxicas se activa la enzima SOD2 mitocondrial (González-Párraga, Alonso-Monge, Plá, & Argüelles, 2010a)

Se desconoce si la dosis de H_2O_2 (4.5 mM) utilizada en nuestro estudio es suficiente para activar la expresión de *SOD2* o si su expresión se encuentra comprometida por las aberraciones ocasionadas por el propio envejecimiento, como ha sido reportado por Kirchman et.al. También es importante considerar que, la expresión de *SOD2* es regulada por la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo; se ha visto en células envejecidas de *S. cerevisiae* que la expresión de *SOD2* esta disminuida cuando se utilizan fuentes de carbono fermentables mientras que con las no fermentables *SOD2* se sobreexpresa (Brown & Trumpower, 1995; Westerbeek-Marres, Moore, & Autor, 1988); en nuestro estudio, todos los experimentos se realizaron utilizando medio YPD, el cual contiene una fuente de carbono fermentable (glucosa) por lo que es posible que la expresión de *SOD2* esté disminuida.

A diferencia de lo observado con la sobreexpresión de los genes que codifican para catalasas y superoxido dimutasas, los resultados muestran que la expresión de *GPX* de *Y. lipolytica* no presentó modificaciones significativas con respecto a los valores basales; su expresión fue solo 2 veces mayor en células jóvenes y ~2.5 veces mayor en células envejecidas. *C.albicans*, cuenta con un solo gen que codifica una glutatión peroxidasa.

8.4 Expresión temprana de los genes *CAT*, *SOD* y *GPX* de *Y. lipolytica* en respuesta al EO.

Otra característica que hace a nuestro estudio interesante, es que no solamente se determinó la expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes (*CAT*, *SOD* y *GPX*) en diferentes etapas de crecimiento de *Y. lipolytica*, sino que dicha expresión, también se avaluó a diferentes tiempos (15 y 60 min) de tratamiento con H₂O₂ (4.5 mM).

Nuestros resultados muestran que todos los genes tuvieron un incremento en su expresión a los 15 min de tratamiento tanto en células jóvenes como envejecidas, mientras que a los 60 min esta expresión se redujo, incluso a niveles semejantes a los basales. En un estudio previo se determinó la expresión de las enzimas antioxidantes en *Y. lipolytica* a los 60 min de tratamiento con H₂O₂ (4.5 mM) y se encontró que bajo estas condiciones hubo una disminución de la expresión de los genes *CAT* con respecto a los controles, hasta 28% más para *CAT2* (Desentis et. al., 2015). En otros estudios Bayliak et.al., (2014) demostraron que en células de *S. pombe* sometidas a EO por efecto del H₂O₂ (20 mM) la actividad de las catalasas disminuyó hasta 40% más que los controles, Sin embargo, es importante recalcar que los estudios anteriormente citados, se realizaron únicamente con células jóvenes.

En nuestro estudio la expresión de los genes, en células envejecidas, fue más acentuada a los 15 min de tratamiento, destacándose la expresión del gen *CAT3*, que alcanzó niveles de expresión hasta ~50 veces mayores que el grupo control (expresión basal). Es posible que en nuestras condiciones experimentales la expresión diferencial temprana de las catalasas esté relacionada a la permeabilidad de la membrana al H₂O₂ como sugiere Folmer et. al., (2008).

De manera similar el gen *SOD1* en células de *Y. lipolytica* tratadas con H_2O_2 (4.5 mM) tuvo un incremento de su expresión a los 15 min en las células envejecidas (~12 veces más que los niveles basales). A los 60 min la expresión se redujo de manera similar en ambas fases de crecimiento. Desentis et.al.,(2015) reportaron que la expresión de *SOD1* se redujo hasta 28% mas que el control a los 60 min de exposición al H_2O_2 , contrario a esto, en nuestro estudio no se mostro una reducción con respecto al control. Tsang et.al., (2014) encontraron que en células de *S. cerevisiae* tratadas con H_2O_2 (0.4 mM) durante 20 min Sod1 cambia su localización: de ser citoplasmático a ser nuclear, para regular la expresión de conjunto de genes de respuesta antioxidante. Considerando lo anterior, en *Y. lipolytica* la función de Sod1 podría no estar relacionada directamente con la eliminación de los radicales libres, sino con otros fenómenos.

Se sabe que el papel principal de la superoxido dismutasas consiste en reducir el radical superoxido a H_2O_2 y O_2 . La enzima sod2 se encuentra en la matriz mitocondrial y, como se comento; su actividad se inhibe en presencia de H_2O_2 o en medios con fuentes de carbono fermentables, por el contrario, se su actividad se incrementa en medios deficientes de fuentes de carbono o en periodos de inanición (Tsang et al., 2014); este panorama podría explicar parcial o totalmente la poca participación de los genes *SOD*, particularmente de *SOD2*, ya que nuestros experimentos se realizaron utilizando un medio de cultivo rico en glucosa, una fuente de carbono fermentable.

Se esperaría que la expresión de *GPX* tuviera una mayor participación ya que la enzima Gpx, es la principal encargada de eliminar el H_2O_2 , por el contrario; en nuestro estudio no se observo un incremento significativo en su expresión con respecto a los valores basales.

Los estudios realizados por Rizvi y Maurya., (2007) son pilares importantes que sustentan nuestros hallazgos y que a su vez, validan y dan credibilidad del uso de *Y. lipolytica* como modelo de estudio para examinar aspectos importantes del papal que tiene el mecanismo de defensa antioxidante durante el envejecimiento. Rizvi y Maurya., (2007) en su estudio “alteraciones de las enzimas antioxidantes durante el envejecimiento en humanos” demuestran que las enzimas Sod y Cat del plasma de las personas ancianas tienen una actividad significativamente mayor que los individuos jóvenes, por lo tanto la inducción de la actividad de Sod y Cat durante el envejecimiento humano puede ser una respuesta compensatoria del individuo a un aumento del EO.

No se han hecho estudios que determinen específicamente la expresión de estos genes bajo condiciones de EO en tiempos cortos de exposición a agentes estresantes. Nuestro estudio, es pues, pionero en la determinación de la respuesta antioxidante de *Y. lipolytica* a condiciones de EO en tiempos cortos.

Nuestro modelo experimental nos permitió determinar que los genes de respuesta antioxidante (*CAT*, *SOD* y *GPX*) tienen una respuesta temprana al EO utilizando una concentración 4.5 mM de H₂O₂, independientemente si las células son jóvenes o envejecidas, pero de manera importante las células envejecidas tienen una mejor respuesta al EO.

La temática del envejecimiento celular y el EO no deja de ser interesante de que a pesar de que se han establecido organismos modelos para dilucidar los mecanismos que están implicados. Son muchas las consideraciones a tener en cuenta que podrían ayudar a esclarecer los mecanismos de la respuesta antioxidante en células envejecidas, brevemente:

- a) Las células metabólicamente activas consumen mucho más oxígeno en condiciones de aireación limitada, por lo que las concentraciones de oxígeno dentro de las células jóvenes podrían estar disminuidas (Jakubowski et al., 2000), si se considera que en cultivos de células envejecidas el metabolismo está atenuado considerablemente, se esperaría que las concentraciones de oxígeno dentro de las células sea más altas y esto comprometería al mecanismo de respuesta antioxidante.
- b) Es bien sabido que el incremento de ERO ocasiona daños a biomoléculas, este incremento de ERO podría modificar la geometría y las propiedades biofísicas de la membrana celular, permitiendo así un flujo descontrolado del H_2O_2 al interior de la célula, por lo tanto, podría ocasionar una respuesta al estrés aún mayor en las células envejecidas que en las células jóvenes.

La evidencia presentada en este trabajo ilustra claramente la notable capacidad de la levadura para detectar y responder de manera apropiada a la amenaza constante del EO, utilizando sus mecanismos de defensa antioxidante. Es importante destacar que estas vías de defensa se conservan en gran medida en los mamíferos, por lo que los resultados mostrados en este trabajo de investigación utilizando *Y. lipolytica* como organismo modelo, pueden ser extrapolables para tratar de entender los mecanismos de respuesta antioxidante de especies de eucariotas superiores, en la escala evolutiva.

9 CONCLUSIONES

En el modelo experimental *Yarrowia. lipolytica*, sometida a EO, se identificaron los genes *ALG9* y *UBC6* que pueden ser utilizados como constitutivos en el análisis de expresión de genes, para estudios de EO.

En las células de *Y. lipolytica*, cultivadas en condiciones normales, se observó que en las células jóvenes la expresión de los genes *CAT1*, *CAT2*, *CAT3*, *SOD1*, *SOD2* y *GPX* fue mayor que en las células envejecidas.

Bajo condiciones de EO, en ambos grupos celulares, los genes *CAT1*, *CAT2*, *CAT3* y *SOD1*, incrementaron su expresión a los 15 min en respuesta al EO ocasionado por el agente oxidante H_2O_2 . Los genes *CAT3* y *SOD1* se expresaron mayoritariamente en células envejecidas. Tanto en las células jóvenes como envejecidas, a los 60 min de tratamiento, la expresión de la mayoría de los genes alcanzó valores semejantes a los basales, a excepción del gen *CAT3* que se mantuvo sobreexpresado.

El presente estudio, es el primer trabajo que analiza la expresión de genes de respuesta antioxidante en células de *Y. lipolytica* sometidas a EO. También es el primer estudio en células de *Y. lipolytica* que utiliza tiempos cortos para el análisis de expresión de los genes en respuesta al EO.

Los hallazgos obtenidos en *Y. lipolytica* son extrapolables a organismos superiores, como el ser humano, lo que ayudaría a entender mejor el rol que tienen los mecanismos de respuesta antioxidante en el desarrollo y progresión de importantes patologías, en donde el EO tiene un papel principal.

10 REFERENCIAS

- Alic, N., Higgins, V. J., & Dawes, I. W. (2001). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* gene that is required for G1 arrest in response to the lipid oxidation product linoleic acid hydroperoxide. *Molecular Biology of the Cell*, 12(6), 1801-1810.
- Allen, C., Büttner, S., Aragon, A. D., Thomas, J. A., Meirelles, O., Jaetao, J. E., Werner-Washburne, M. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary phase cultures. *The Journal of Cell Biology*, 174(1), 89-100. doi:10.1083/jcb.200604072
- Anderson, E. J., Lustig, M. E., Boyle, K. E., Woodlief, T. L., Kane, D. A., Lin, C.-T., Neuffer, P. D. (2009). Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(3), 573-581. doi:10.1172/JCI37048
- Arinbasarova, A. Y., Biryukova, E. N., & Medentsev, A. G. (2015). Antistress systems of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 135-142. doi:10.1134/S0003683815020027
- Balistreri, C. R., Caruso, C., & Candore, G. (2010). The role of adipose tissue and adipokines in obesity related inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation*, 2010, 802078. doi:10.1155/2010/802078
- Bansal, M., & Kaushal, N. (2014). Introduction to oxidative stress oxidative stress mechanisms and their modulation (pp. 1-18): *Springer India*.
- Bar-Shai, M., Carmeli, E., Ljubuncic, P., & Reznick, A. Z. (2008). Exercise and immobilization in aging animals: The involvement of oxidative stress and NF-κB activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 202-214. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.019>
- Barker, M. G., Brimage, L. J. E., & Smart, K. A. (1999). Effect of CuZn Superoxide Dismutase disruption mutation on replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 177(2), 199-204. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13732.x
- Barth, G., & Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(4), 219-237.
- Bartosz, G. (2005). Superoxide Dismutases and Catalase. In T. Grune (Ed.), *Reactions, Processes* (Vol. 20, pp. 109-149): Springer Berlin Heidelberg.

- Bayliak, M. M., Burdyluk, N. I., Izers'ka, L. I., & Lushchak, V. I. (2014). Concentration dependent effects of rhodiola rosea on long term survival and stress resistance of yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: The Involvement of YAP 1 and MSN2/4 Regulatory Proteins. *Dose Response*, 12(1), 93-109. doi:10.2203/dose-response.13-013.Bayliak
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78(2), 547-581.
- Bitterman, K. J., Medvedik, O., & Sinclair, D. A. (2003). Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability and heterochromatin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 376-399. doi:10.1128/MMBR.67.3.376-399.2003
- Bondia-Pons, I., Ryan, L., & Martinez, J. A. (2012). Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68(4), 701-711. doi:10.1007/s13105-012-0154-2
- Brown, T. A., & Trumpower, B. L. (1995). Strain dependent variation in carbon source regulation of nucleus encoded mitochondrial proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 177(5), 1380-1382.
- Carmona-Gutierrez, D., & Büttner, S. (2014). The many ways to age for a single yeast cell. *Yeast*, 31(8), 289-298. doi:10.1002/yea.3020
- Celińska, E., & Grajek, W. (2013). A novel multigene expression construct for modification of glycerol metabolism in *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories*, 12, 102-102. doi:10.1186/1475-2859-12-102
- Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I., & De Las Peñas, A. (2008). High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single Catalase, Cta1p, and is Controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryotic Cell*, 7(5), 814-825. doi:10.1128/EC.00011-08
- Dawson, N. J., Katzenback, B. A., & Storey, K. B. (2015). Free radical first responders: The characterization of CuZnSOD and MnSOD regulation during freezing of the freeze tolerant North American wood frog, *Rana sylvatica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*, 1850(1), 97-106. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.003>
- Desentis D.M.F. & Campos G.E. (2015). Expresión de genes que codifican para enzimas de la respuesta antioxidante de *Yarrowia lipolytica*, bajo condiciones de estrés oxidativo (tesis de maestría). Facultad de Salud Pública y Nutrición, Monterrey N. León.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Dulermo, R., Gamboa-Meléndez, H., Dulermo, T., Thevenieau, F., & Nicaud, J.-M. (2014). <div xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml"><div>The fatty acid transport protein Fat1p is involved in the export of fatty acids from lipid bodies in Yarrowia lipolytica</div></div>. *FEMS Yeast Research*, 14(6), 883.

- Egilmez, N. K., & Jazwinski, S. M. (1989). Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 171(1), 37-42.
- Eisenberg, T., & Büttner, S. (2014). Lipids and cell death in yeast. *Fems Yeast Research*, 14(1), 179-197. doi:10.1111/1567-1364.12105
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Buttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol*, 11(11), 1305-1314. doi:http://www.nature.com/ncb/journal/v11/n11/supinfo/ncb1975_S1.htm
- Epp, O., Ladenstein, R., & Wendel, A. (1983). The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0.2-nm Resolution. *European Journal of Biochemistry*, 133(1), 51-69. doi:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07429.x
- Fabrizio, P., Pletcher, S. D., Minois, N., Vaupel, J. W., & Longo, V. D. (2004). Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 557(1-3), 136-142. doi:10.1016/S0014-5793(03)01462-5
- Farrugia, G., & Balzan, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in Yeast. *Frontiers in Oncology*, 2, 64. doi:10.3389/fonc.2012.00064
- Folmer, V., Pedroso, N., Matias, A. C., Lopes, S. C. D. N., Antunes, F., Cyrne, L., & Marinho, H. S. (2008). H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1778(4), 1141-1147. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.12.008>
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752-1761. doi:10.1172/JCI200421625
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of Yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4241-4257.
- Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J. M., Berardi, E., Veenhuis, M., & van der Klei, I. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*. A comparison. *FEMS Yeast Research*, 5(11), 1079-1096. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.06.004>
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., Labarre, J. (1998). The H₂O₂ Stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22480-22489.
- Grzelak, A., Macierzyńska, E., & Bartosz, G. (2006). Accumulation of oxidative damage during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Gerontology*, 41(9), 813-818. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2006.06.049>

- Grzelak, A., Skierski, J., & Bartosz, G. (2001). Decreased antioxidant defense during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* studied using the 'baby machine' method. *FEBS Letters*, 492(1-2), 123-126. doi:10.1016/S0014-5793(01)02244-X
- Guo, H., Madzak, C., Du, G., Zhou, J., & Chen, J. (2014). Effects of pyruvate dehydrogenase subunits overexpression on the α -ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 7003-7012. doi:10.1007/s00253-014-5745-0
- González-Párraga, P., Alonso-Monge, R., Plá, J., & Argüelles, J. C. (2010a). Adaptive tolerance to oxidative stress and the induction of antioxidant enzymatic activities in *Candida albicans* are independent of the Hog1 and Cap1-mediated pathways. *FEMS Yeast Research*, 10(6), 747-756. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00654.x
- González-Párraga, P., Alonso-Monge, R., Plá, J., & Argüelles, J. C. (2010b). <div xmlns="http://www.w3.org/1999/xhtml">Adaptive tolerance to oxidative stress and the induction of antioxidant enzymatic activities in Candida albicans are independent of the Hog1 and Cap1-mediated pathways</div>. *FEMS Yeast Research*, 10(6), 747.
- Harman, D. (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298-300.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Fröhlich, K.-U., Wissing, S., Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 164(4), 501-507. doi:10.1083/jcb.200310014
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). General Subjects*, 1780(11), 1217-1235. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>
- Hochman, A., Figueredo, A., & Wall, J. D. (1992). Physiological functions of hydroperoxidases in *rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, 174(10), 3386-3391.
- Holzenberger, M. (2004). The role of insulin like signalling in the regulation of ageing. *Hormone Research in Paediatrics*, 62(1), 89-92.
- Ivancich, A., & Loewen, P. (2013). Electron transfer in catalases and catalase peroxidases. In G. K. Roberts (Ed.), *Encyclopedia of Biophysics* (pp. 611-614): Springer Berlin Heidelberg.
- Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320(Pt 1), 61-67.
- Jakubowski, W., Biliński, T., & Bartosz, G. (2000). Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(5), 659-664. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00266-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00266-X)
- Jay Forman, H., & Torres, M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine*, 22(4-5), 189-216. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0098-2997\(01\)00010-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-2997(01)00010-3)
- Jazwinski, S. M. (2003). Yeast longevity and aging. In H. Osiewacz (Ed.), *Aging of Organisms* (Vol. 4, pp. 1-30): Springer Netherlands.

- Jones, D. P. (2008). Radical free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 295(4), C849-C868.
doi:10.1152/ajpcell.00283.2008
- Kanauchi, M., Nishioka, H., & Hashimoto, T. (2002). Oxidative DNA damage and tubulointerstitial Injury in diabetic nephropathy. *Nephron*, 91(2), 327-329.
- Katic, M., & Kahn, C. R. (2005). The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(3), 320-343.
doi:10.1007/s00018-004-4297-y
- Kirchman, P. A., Kim, S., Lai, C. Y., & Jazwinski, S. M. (1999). Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 152(1), 179-190.
- Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 44-50.
doi:10.1016/j.tibs.2006.11.003
- Konat, G. (2003). H₂O₂ induced higher order chromatin degradation: A novel mechanism of oxidative genotoxicity. *Journal of Biosciences*, 28(1), 57-60.
doi:10.1007/BF02970132
- Kruegel, U., Robison, B., Dange, T., Kahlert, G., Delaney, J. R., Kotireddy, S., Schmidt, M. (2011). Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 7(9), e1002253.
doi:10.1371/journal.pgen.1002253
- Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigó, R., & Gladyshev, V. N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300(5624), 1439-1443.
doi:10.1126/science.1083516
- Kuhajda, F. P. (2006). Fatty acid synthase and cancer: New application of an old pathway. *Cancer Research*, 66(12), 5977.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). Chapter 1. Definition, classification and nomenclature of the Yeasts. In C. P. K. W. F. Boekhout (Ed.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (pp. 3-5). London: Elsevier.
- Lachance, M.A. (2006). Yeast biodiversity: how many and how much? In G. Péter & C. Rosa (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 1-9): Springer Berlin Heidelberg.
- Lam, Y. T., Aung-Htut, M. T., Lim, Y. L., Yang, H., & Dawes, I. W. (2011). Changes in reactive oxygen species begin early during replicative aging of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(8), 963-970. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.013>
- Larsen, P. L. (1993). Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(19), 8905-8909.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Breitenbach, M. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1166-1173. doi:10.1111/j.1365-2958.2001.02317.x

- Lazar, Z., Walczak, E., & Robak, M. (2011). Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. *Bioresource Technology*, 102(13), 6982-6989.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.032>
- Lesur, I., & Campbell, J. L. (2004). The transcriptome of prematurely aging yeast cells is similar to that of telomerase deficient cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1297-1312. doi:10.1091/mbc.E03-10-0742
- Li, C., & Clarke, S. (1992). A protein methyltransferase specific for altered aspartyl residues is important in *Escherichia coli* stationary phase survival and heat shock resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), 9885-9889.
- Llanos, A., François, J. M., & Parrou, J.-L. (2015). Tracking the best reference genes for RT-qPCR data normalization in filamentous fungi. *BMC Genomics*, 16(1), 71. doi:10.1186/s12864-015-1224-y
- Longo, V. D., Gralla, E. B., & Valentine, J. S. (1996). Superoxide Dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*: mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12275-12280. doi:10.1074/jbc.271.21.12275
- Longo, V. D., Shadel, G. S., Kaerberlein, M., & Kennedy, B. (2012). Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metabolism*, 16(1), 18-31. doi:10.1016/j.cmet.2012.06.002
- Lopes, M., Mota, M., & Belo, I. (2013). Comparison of *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pastoris* cellular response to different agents of oxidative stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(2), 448-458. doi:10.1007/s12010-013-0205-3
- Madamanchi, N., & Runge, M. (2005). Oxidative stress. *Principles of Molecular Cardiology* (pp. 549-562): Humana Press.
- Maiorino, M., Roveri, A., Ursini, F., & Gregolin, C. (1985). Enzymatic determination of membrane lipid peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1(3), 203-207. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90119-9](http://dx.doi.org/10.1016/0748-5514(85)90119-9)
- Marra, G., Cotroneo, P., Pitocco, D., Manto, A., Di Leo, M. A. S., Ruotolo, V., Santini, S. A. (2002). Early increase of oxidative stress and reduced antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1 Diabetes: A case for gender difference. *Diabetes Care*, 25(2), 370-375.
- Martins, D., & English, A. M. (2014). Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast(). *Redox Biology*, 2, 308-313. doi:10.1016/j.redox.2013.12.019
- Marín-García, J., Goldenthal, M., & Moe, G. (2008). Post genomic view of aging: definitions, theories and observations *Aging and the Heart* (pp. 3-31): Springer US.
- Maté, M. J., Zamocky, M., Nykyri, L. M., Herzog, C., Alzari, P. M., Betzel, C., Fita, I. (1999). Structure of catalase a from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, 286(1), 135-149. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1998.2453>

- Mauersberger, S., Wang, H.-J., Gaillardin, C., Barth, G., & Nicaud, J.-M. (2001). Insertional mutagenesis in the n-Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of Tagged Mutations in Genes Involved in Hydrophobic Substrate Utilization. *Journal of Bacteriology*, 183(17), 5102-5109. doi:10.1128/JB.183.17.5102-5109.2001
- McCabe, M. J., Nicotera, P., & Orrenius, S. (1992). Calcium-Dependent Cell Death Role of the Endonuclease, Protein Kinase C, and Chromatin Conformation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 663(1), 269-278. doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb38670.x
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- McFaline-Figueroa, J. R., Vevea, J., Swayne, T. C., Zhou, C., Liu, C., Leung, G., Pon, L. A. (2011). Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. *Aging cell*, 10(5), 885-895. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00731.x
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M. S., Walker, D. W., Clayton, P. E., Lithgow, G. J. (2000). Extension of Life-Span with Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics. *Science*, 289(5484), 1567-1569.
- Mortimer, R. K., & Johnston, J. R. (1959). Life Span of Individual Yeast Cells. *Nature*, 183(4677), 1751-1752.
- Nadai, C., Campanaro, S., Giacomini, A., & Corich, V. (2015). Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies during *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation in the presence of sulfite. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 49-56. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.012>
- Nishimoto, T., Watanabe, T., Furuta, M., Kataoka, M., & Kishida, M. (2016). Roles of Catalase and Trehalose in the Protection from Hydrogen Peroxide Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocontrol Science*, 21(3), 179-182. doi:10.4265/bio.21.179
- Osiewacz, H. D., & Hamann, A. (2006). Senescence and Longevity. In U. Kues & R. Fischer (Eds.), *Growth, Differentiation and Sexuality* (Vol. 1, pp. 189-200): Springer Berlin Heidelberg.
- Pan, Y., Schroeder, E. A., Ocampo, A., Barrientos, A., & Shadel, G. S. (2011). Regulation of Yeast Chronological Life Span by TORC1 via Adaptive Mitochondrial ROS Signaling. *Cell metabolism*, 13(6), 668-678. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.018
- Park, J.-I., Grant, C. M., Davies, M. J., & Dawes, I. W. (1998). The Cytoplasmic Cu,Zn Superoxide Dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* Is Required for Resistance to Freeze-Thaw Stress: generation of free radicals during freezing and thawing. *Journal of Biological Chemistry*, 273(36), 22921-22928.
- Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixeira, F., Dunand, C. (2007). PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry*, 68(12), 1605-1611. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.005>

- Perk, J., De Backer, G., Gohlke, H., Graham, I., Reiner, Ž., Verschuren, M., Wolpert, C. (2012). European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *European Heart Journal*, 33(13), 1635-1701.
- Pohley, H.-J. (1987). A formal mortality analysis for populations of unicellular organisms (*Saccharomyces cerevisiae*). *Mechanisms of Ageing and Development*, 38(3), 231-243. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0047-6374\(87\)90092-3](http://dx.doi.org/10.1016/0047-6374(87)90092-3)
- Powers, K., Oberley, L., & Domann, F. (2008). The Adventures of Superoxide Dismutase in Health and Disease: Superoxide in the Balance. In G. Valacchi & P. Davis (Eds.), *Oxidants in Biology* (pp. 183-201): Springer Netherlands.
- Rizvi, S. I., & Maurya, P. K. (2007). Alterations in Antioxidant Enzymes During Aging in Humans. *Molecular Biotechnology*, 37(1), 58-61. doi:10.1007/s12033-007-0048-7
- Rockenfeller, P., & Madeo, F. (2010). Ageing and eating. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(4), 499-506. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.001>
- Rona, G., Herdeiro, R., Mathias, C. J., Torres, F. A., Pereira, M. D., & Eleutherio, E. (2015). CTT1 overexpression increases life span of calorie restricted *Saccharomyces cerevisiae* deficient in Sod1. *Biogerontology*, 16(3), 343-351. doi:10.1007/s10522-015-9550-7
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, 340(2), 115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207
- Rupérez, A. I., Gil, A., & Aguilera, C. M. (2014). Genetics of oxidative stress in obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 3118-3144. doi:10.3390/ijms15023118
- Sarı, M., Akgöl, S., Karataş, M., & Denizli, A. (2006). Reversible immobilization of catalase by metal chelate Affinity Interaction on Magnetic Beads. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(9), 3036-3043. doi:10.1021/ie0507979
- Shin, C. S., Moon, B. S., Park, K. S., Kim, S. Y., Park, S. J., Chung, M. H., & Lee, H. K. (2001). Serum 8-Hydroxy-Guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care*, 24(4), 733-737.
- Sinclair, D. A. (1999). Yeast aging research: recent advances and medical relevance. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 56(9-10), 807-816. doi:10.1007/s000180050027
- Sivitz, W. (2014). Mitochondria and Oxidative Stress in Diabetes. In I. Obrosova, M. J. Stevens, & M. A. Yorek (Eds.), *Studies in Diabetes* (pp. 63-92): Springer New York.
- Sohal, R. S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5271), 59-63.
- Spevak, W., Fessl, F., Rytka, J., Traczyk, A., Skoneczny, M., & Ruis, H. (1983). Isolation of the catalase T structural gene of *Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation. *Molecular and Cellular Biology*, 3(9), 1545-1551.

- Stocker, R., & Keaney, J. F. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 84(4), 1381-1478.
- Takahashi, K., Akasaka, M., Yamamoto, Y., Kobayashi, C., Mizoguchi, J., & Koyama, J. (1990). Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *The Journal of Biochemistry*, 108(2), 145-148.
- Tepper, R. G., Ashraf, J., Kaletsky, R., Kleemann, G., Murphy, C. T., & Bussemaker, H. J. (2013). PQM-1 complements DAF-16 as a key transcriptional regulator of DAF-2-mediated development and longevity. *Cell*, 154(3), 676-690. doi:10.1016/j.cell.2013.07.006
- Teste, M.A., Duquenne, M., François, J. M., & Parrou, J.-L. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Molecular Biology*, 10, 99-99. doi:10.1186/1471-2199-10-99
- Toppo, S., Vanin, S., Bosello, V., & Tosatto, S. C. E. (2008). Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1501-1514. doi:10.1089/ars.2008.2057
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Valle, N. R.-D., & Huang, P. (2008). Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8), 1343-1374. doi:10.1089/ars.2007.1957
- Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiological Reviews*, 93(1), 1.
- Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 347-355. doi:10.1079/BJN20041213
- Tsang, C. K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., & Zheng, X. F. S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature communications*, 5, 3446-3446. doi:10.1038/ncomms4446
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029-1033. doi:10.1126/science.1160809
- Varnum, S., Sowa, M., & Morgan, W. (2013). Oxidative Stress. In L. Brady & T. Yaeger (Eds.), *Encyclopedia of Radiation Oncology* (pp. 583-583): Springer Berlin Heidelberg.
- Wenzel, T. J., Teunissen, A. W., & de Steensma, H. Y. (1995). PDA1 mRNA: a standard for quantitation of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* superior to ACT1 mRNA. *Nucleic Acids Research*, 23(5), 883-884.
- Westerbeek-Marres, C. A. M., Moore, M. M., & Autor, A. P. (1988). Regulation of manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 174(4), 611-620. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14142.x

- Yin, X., Madzak, C., Du, G., Zhou, J., & Chen, J. (2012). Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(6), 1527-1537. doi:10.1007/s00253-012-4192-z
- Yorimitsu, T., Zaman, S., Broach, J. R., & Klionsky, D. J. (2007). Protein kinase a and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 18(10), 4180-4189. doi:10.1091/mbc.E07-05-0485
- Zhang, Y., Luo, C., Zou, K., Xie, Z., Brandman, O., Ouyang, Q., & Li, H. (2012). Single cell analysis of yeast replicative aging using a new generation of Microfluidic Device. *PLoS ONE*, 7(11), e48275. doi:10.1371/journal.pone.0048275